

Ina Koch

**Untersuchungen zur
spezifischen Genexpression in
humanen Hepatomzellen**

**Eine HBV Hybrid mRNA mit
mitochondrialen Domänen**

**Expression eines cytoplasmatischen
Antigens als Folge der malignen Entartung**

Disbui. München

1989

Hannes Gertner Verlag München



Ina Koch
Untersuchungen zur spezifischen Genexpression
in humanen Hepatomzellen

Vorliegende Untersuchung wurde im Jahr 1989
von dem Fachbereich Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
als Dissertation angenommen

ISBN 3-925632-06-9

Copyr.: Hannes Gertner Verlag München
Alle Rechte vorbehalten
Nachdruck und Vervielfältigung
nur mit Genehmigung des Verlages

Druck: Altstadt Schnelldruck 8540 Schwabach

Untersuchungen zur spezifischen Genexpression
in humanen Hepatomzellen

(a) Eine HBV Hybrid mRNA mit mitochondrialen Domänen

(b) Eine HBV Hybrid mRNA mit mitochondrialen Domänen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Ina Koch
aus Duisburg

München, 1988

Mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Gutachter: Prof.Dr. Wolf Gutensohn
2. Gutachter: Prof.Dr. Hartwig Cleve
- Sondergutachter: Prof.Dr.Dr. Peter Hans Hofschneider

Tag der mündl. Prüfung: 06.02.1989

Meinen Eltern

1	Ich habe euch sehr lieb und bin stolz auf euch.	1
2	Ihr habt mich immer unterstützt und mich gelehrt.	2
3	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	3
4	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	4
5	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	5
6	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	6
7	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	7
8	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	8
9	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	9
10	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	10
11	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	11
12	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	12
13	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	13
14	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	14
15	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	15
16	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	16
17	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	17
18	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	18
19	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	19
20	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	20
21	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	21
22	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	22
23	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	23
24	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	24
25	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	25
26	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	26
27	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	27
28	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	28
29	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	29
30	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	30
31	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	31
32	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	32
33	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	33
34	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	34
35	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	35
36	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	36
37	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	37
38	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	38
39	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	39
40	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	40
41	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	41
42	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	42
43	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	43
44	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	44
45	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	45
46	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	46
47	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	47
48	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	48
49	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	49
50	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	50
51	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	51
52	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	52
53	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	53
54	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	54
55	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	55
56	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	56
57	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	57
58	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	58
59	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	59
60	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	60
61	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	61
62	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	62
63	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	63
64	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	64
65	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	65
66	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	66
67	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	67
68	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	68
69	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	69
70	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	70
71	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	71
72	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	72
73	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	73
74	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	74
75	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	75
76	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	76
77	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	77
78	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	78
79	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	79
80	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	80
81	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	81
82	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	82
83	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	83
84	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	84
85	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	85
86	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	86
87	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	87
88	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	88
89	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	89
90	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	90
91	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	91
92	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	92
93	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	93
94	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	94
95	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	95
96	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	96
97	Ich werde euch alles erzählen, was ich erlebt habe.	97
98	Ihr habt mich immer ermutigt und mich gelehrt.	98
99	Ich hoffe, ich werde euch bald besuchen können.	99
100	Ihr seid meine besten Freunde und ich liebe euch.	100

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried bei München) in der Abteilung Virusforschung unter der Leitung von Professor Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Dr. P.H. Hofschneider danke ich für sein Interesse und die damit verbundene Förderung der Arbeit. Herrn Dr. Rajen Koshy danke ich für die Betreuung im Labor und für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Professor Dr. W. Gutensohn danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Für die Durchführung der Peptidspaltung und die anschließende Peptidsequenzierung danke ich Herrn Christoph Eckerskorn und Herrn Dr. Friedrich Lottspeich.

Mein besonderer Dank gilt Frl. Gabriele Handschuh, die als Praktikantin im Labor großen Anteil an der Durchführung vieler Experimente hatte.

Für viele nützliche Diskussionen möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung Virusforschung bedanken.

Für technische Anleitung und Hilfe im Labor und in der Gewebekultur danke ich Fr. Elisabeth Bürgelt und Fr. Irene Dick.

INHALTSVERZEICHNIS

A	ZUSAMMENFASSUNG	1
B	EINLEITUNG	3
1.	Die Gruppe der Hepadna Viren	3
2.	Aufbau des Hepatitis B Virus	3
3.	Genomorganisation	4
4.	Infektion der Zellen und Replikation	6
5.	Expression des HBV Genoms	8
6.	Verlaufsformen einer Hepatitis B Virus Infektion	9
7.	Struktur integrierter HBV DNA in primären Leberzellkarzinomen	11
8.	Modelle einer HBV induzierten Karzinogenese	12
8.1	Insertionelle Mutagenese	13
8.2	Direkte Onkogenese	13
8.3	Indirekte Onkogenese	14
9.	Spezifische Veränderungen in der Antigenexpression einer Tumorzelle	16
10.	Problemstellung	17
C	ERGEBNISSE	21
1.	Klonierung HBV spezifischer mRNAs aus der humanen Hepatomzelllinie PLC/PRF/5	21
1.1	Erstellung einer cDNA Bank	22
1.1.1	Wahl des Vektors	22
1.1.2	Strategie der cDNA Synthese und Erstellung der cDNA Bank	22
1.2	Isolierung HBV spezifischer cDNA Klone	29
1.2.1	Identifizierung HBV Sequenzen enthaltender cDNAs	29
1.2.2	Reklonierung der HBV Sequenzen enthaltenden cDNAs	29
1.3	Charakterisierung der cDNAs	30

1.3.1	Charakterisierung von pcAL-40 und pcAL-41	30
1.3.2	Charakterisierung von pcAL-36	32
1.3.2.1	Restriktionskartierung von pcAL-36	32
1.3.2.2	pcAL-36 als Sonde für einen genomischen Southern Blot	35
1.3.2.3	Sequenzanalyse von pcAL-36	35
1.3.2.3.1	Besonderheiten der Sequenz von pcAL-36	39
1.3.2.3.2	Flankierende zelluläre Sequenzen am 3' Ende von pcAL-36	39
1.3.2.3.3	Virale Sequenzen	40
1.3.2.3.4	Flankierende zelluläre Sequenzen am 5' Ende von pcAL-36	42
1.3.2.4	Nachweis der AL-36 mRNA und der genomischen Sequenz	43
1.3.2.5	Mögliche Expressionssignale für die AL-36 mRNA	49
1.3.2.6	Leserahmen in AL-36	51
1.3.2.6.1	Überprüfung der Translationsprodukte der AL-36 mRNA in vitro	52
1.4	Zwischenzusammenfassung	53
2.	Identifizierung eines tumorassoziiert exprimierten Antigens in der PLC/PRF/5 Zelllinie	54
2.1	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen PLC/PRF/5 Zellen	54
2.2	Identifizierung eines tumorspezifischen Antigens mit einem monoklonalen Antikörper	55
2.2.1	Bestimmung des Subtyps des monoklonalen Antikörpers	55
2.3	Charakterisierung der Expression von PLC-43	55
2.3.1	Expression von PLC-43 in humanen Hepatomzelllinien, Hepatomen und normalem menschlichen Lebergewebe	56
2.3.1.1	Expression in humanen Hepatomzelllinien	56
2.3.1.2	Expression von PLC-43 unter HBV-Einfluß	56

2.3.1.3	Expression von PLC-43 in PLC/PRF/5 Zellen nach Differenzierung mit Retinsäure	58
2.3.1.4	Expression in soliden HCCs, Peritumorgewebe und normalem Lebergewebe	60
2.3.1.5	Expression in Murmeltier ("Woodchuck") Hepatomen und Leber	60
2.3.2	PLC-43 Expression in humanen malignen und normalen Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs	63
2.3.3	PLC-43 Expression in peripheren Blutlymphozyten	64
2.3.4	Expression in Mäuse- und Ratten- zelllinien	67
2.3.5	Zuordnung von PLC-43 zu einer der Klassen tumorspezifischer Antigene	69
2.4	Lokalisation von PLC-43 in der Zelle	70
2.5	Biochemische Charakterisierung von PLC-43	71
2.5.1	Untersuchung der Glykosylierung	71
2.5.2	Untersuchung der Phosphorylierung	71
3.	Immunoscreening der Lambda gt11 cDNA Bank mit PLC-43	73
4.	Isolierung von PLC-43	74
4.1	Isolierung von PLC-43 zum Sequenzieren	75
4.2	Sequenzierung	77
5.	Zwischenzusammenfassung	82
D	DISKUSSION	83
1.	Expression einer Hybrid-HBV mRNA mit mitochondrial-ähnlichen Sequenzen	84
1.1	Die AL-36 mRNA - ein Transkript der genomischen HBV Integrate AL10.5 oder AL10.7	84

1.2	Mitochondriale Sequenzen am 5' Ende der AL-36 mRNA	84
1.3	Entstehung des AL-36 Gens	85
1.4	Mögliche Funktionen der AL-36 mRNA	88
2.	Expression eines tumorspezifischen, cytoplasmatischen Antigens in Hepatozellulären Karzinomen und anderen Tumoren	89
2.1	Tumorspezifische Antigene und zelluläre Onkogene	90
2.2	Expression tumorspezifischer Antigene in Hepatomzellen	91
2.3	Identifizierung eines bisher unbekannten, cytoplasmatischen Tumorantigens in einer humanen Hepatomzelllinie	92
2.4	PLC-43 Expression in verschiedenen Stadien der malignen Entartung	93
2.5	PLC-43 als Ziel der Transaktivierung durch HBV?	95
2.6	Mögliche Funktionen spezifisch exprimierter Elongationsfaktoren in transformierten Zellen	96
2.7	Ist PLC-43 ein zelluläres Onkogenprodukt?	97
E	MATERIAL UND METHODEN	99
1.	Material	99
1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	99
1.2	Enzyme	101
1.3	Biologisches Material	102
1.3.1	Zelllinien	102
1.3.2	Gewebe	104
1.3.3	Bakterienstämme	104
1.3.4	Plasmide	105
1.3.5	Phagen	105

2.	Methoden	106
2.1	Allgemein benötigte Puffer und Medien	106
2.2	Zellkultur	107
2.2.1	Transfektion eukaryotischer Zellen	107
2.2.2	In vivo Markierung von Zellkulturen mit ^{32}P	107
2.2.3	Isolierung und Kultivierung peripherer Blutlymphozyten	108
2.3	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Hepatomzellen	109
2.3.1	Immunisierungsschema	109
2.3.2	Präparation von Makrophagen als Futterzellen für Hybridomazellen	109
2.3.3	Fusion von Mausmilzzellen und Mausmyelomzellen	110
2.3.4	Selektion antikörperproduzierender Hybridomazellen	111
2.3.5	Reklonierung von Hybridomzellklonen	111
2.4	Proteinchemische Methoden	112
2.4.1	Herstellung von Proteingesamtzellextrakten	112
2.4.2	Herstellung von cytoplasmatischen Proteinextrakten	112
2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Schaffner und Weissmann	113
2.4.4	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese	114
2.4.4.1	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue	115
2.4.4.2	Silberfärbung von Proteingelen	115
2.4.5	Aufreinigung monoklonaler Antikörper	116
2.4.5.1	Anreicherung der Immunglobuline aus Medienüberständen	116
2.4.5.2	Reinigung der Immunglobuline	116
2.5	Immunologische Nachweismethoden	117
2.5.1	Western Blot	117

2.5.1.1	Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose	117
2.5.1.2	Antikörperreaktion	117
2.5.2	ELISA	118
2.5.3	Immunfluoreszenz	119
2.5.3.1	Vorbereitung von Zellen für die Immunfluoreszenz	119
2.5.3.2	Vorbereitung von Gewebeschnitten für die Immunfluoreszenz	119
2.5.3.3	Antikörperreaktion	120
2.5.4	Immunperoxidasefärbung von Zellen und Gewebeschnitten	120
2.6	Antigenisolierung durch Affinitätschromatographie	120
2.6.1	Kopplung von Immunglobulinen an CNBr-aktivierte Sepharose CL 4B	121
2.6.1.1	Isolierung des Antigens mit Sepharose CL4B-68	121
2.6.2	Isolierung des Antigens mit Protein A Sepharose CL 4B	122
2.6.2.1	Isolierung durch Säulenchromatographie	122
2.6.2.2	Isolierung im Batch Verfahren	122
2.7	Isolierung von RNA	123
2.7.1	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen	123
2.7.2	Isolierung von RNA aus Gewebe	123
2.7.3	Isolierung polyadenylierter RNA aus Gesamt-RNA	124
2.8	Elektrophorese von RNA	125
2.9	Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose ("Northern Blot")	125
2.10	DNA-Isolierungen	126
2.10.1	Fällen und Lösen von Nukleinsäuren	126
2.10.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	116
2.10.3	Präparation von Plasmid DNA durch alkalische Lyse	126
2.10.4	Plasmidschnellpräparation	127

2.10.5	Isolierung chromosomaler DNA aus eukaryotischen Zellen oder Geweben	127
2.10.6	Präparation von DNA aus Zellkernen	128
2.10.7	Präparation von Phagen DNA	129
2.10.8	Präparation von Phagen DNA im kleinen Maßstab	129
2.11	Elektrophorese von DNA	130
2.11.1	Präparative Gelelektrophorese	130
2.11.1.1	Elektroelution auf Ionenaustauscherpapier DE81	130
2.11.1.2	Elektroelution in einen Dialyseschlauch	131
2.11.2	Alkalische Agarosegelelektrophorese	131
2.12	Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose ("Southern Blot")	131
2.13	Radioaktive Markierung von DNA	132
2.13.1	Nicktranslation	132
2.13.2	Markierung durch "Random-Primer" Synthese	133
2.14	Hybrisierung von Nitrozellulosefiltern (Southern oder Northern Blots und Plaquehybridisierung)	133
2.15	Re- und Subklonierung von DNA Fragmenten in Plasmide	134
2.15.1	Restriktion	134
2.15.2	Dephosphorylierung	134
2.15.3	Auffüllen von 5' überhängenden Enden	135
2.15.4	Ligation	135
2.15.5	Herstellung kompetenter Bakterien	135
2.15.6	Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmiden	136
2.16	Sequenzierung von DNA	136
2.16.1	Präparation der Plasmid-DNA zum Sequenzieren	137
2.16.2	Denaturierung und Hybridisierung des Primers	137
2.16.3	Sequenzierreaktion	138
2.16.4	Sequenzgel	139
2.17	Synthese und Klonierung von cDNA	139

2.17.1	Oligo dT geprimete Synthese des 1. Stranges	140
2.17.2	Synthese des zweiten Stranges	141
2.17.3	S1 Nuklease Verdau der Haarnadelstrukturen	142
2.17.4	Methylierung von EcoRI Schnittstellen	143
2.17.5	Auffüllen überhängender Enden mit DNA Polymerase I, Klenow Fragment	143
2.17.6	Ligation von EcoRI Linkern	143
2.17.7	Abtrennung der freien Linker von der cDNA	144
2.17.8	Ligation mit dem Vektor lambda gt11	144
2.17.9	In vitro Verpackung von Phagen DNA in Phagenköpfe	144
2.17.10	Ausplattieren von Phagen auf Indikatorbakterien	145
2.17.11	Herstellung von lambda gt11 Plattenlysaten	145
2.17.12	Herstellung lysogener, lambda gt11 haltiger Bakterien	145
2.18	Identifizierung spezifischer cDNA Klone	146
2.18.1	Identifizierung von cDNA Klonen mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	146
2.18.2	Screening der cDNA Bank mit Antikörpern	146
2.19	In vitro Expression klonierten cDNA	147
2.19.1	In vitro Transkription	147
2.19.2	In vitro Translation	148
F	LITERATUR	148
G	ABKÜRZUNGEN	160
H	LEBENS LAUF	162

A

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entstehung eines primären Leberzellkarzinoms ist - vor allem in Asien und Afrika - eng mit einer persistenten HBV Infektion korreliert. Die virale DNA wird in den Lebertumoren häufig chromosomal integriert gefunden. Untersuchungen dieser Integrate konnten bis heute keinen generellen Mechanismus für eine HBV assoziierte Karzinogenese aufzeigen. Es gibt jedoch vermehrt Hinweise darauf, daß nach Expression dieser integrierten Sequenzen ein onkogener Einfluß der HBV Sequenzen in "trans" durch Stimulierung der Expression zellulärer Gene erfolgen kann.

Aus diesem Grunde wurden HBV spezifische mRNAs aus der humanen Hepatomzelllinie PLC/PRF/5 kloniert und charakterisiert. Alle drei isolierten cDNA Klone enthielten Sequenzen aus dem S-Genbereich. Ein cDNA Klon (pcAL-36) repräsentiert eine Hybrid-mRNA, welche neben viralen sowohl am 5' als auch am 3' Ende zelluläre Sequenzen enthält. Die mRNA ist zweimal gespleißt: einmal am Beginn der HBV Sequenzen und ein zweites Mal in den 3' zellulär flankierenden Sequenzen. Die 3' zellulären Sequenzen sind bis zu der Spleißstelle homolog zu den zellulären Sequenzen von zwei klonierten genomischen Integraten dieser Zelllinie (AL10.5 und AL10.7) und deuten darauf hin, daß die AL-36 mRNA von einem dieser Integrate transkribiert wurde. Die viralen Sequenzen überspannen den S- und X-Genbereich, wobei das S-Gen am 5' Ende und das X-Gen am 3' Ende trunziert ist. Der 5' zu den viralen Sequenzen gelegene Abschnitt weist eine Homologie zu dem kodogenen Strang des mitochondrialen Leserahmens URF4 auf. Eine oder mehrere Kopien dieses Leserahmens sind physiologischerweise in das Kerngenom integriert. Auf diesen kerngenomischen URF4 Sequenzen liegt vermutlich der Promotor, der die Expression der AL-36 mRNA steuert. Aufgrund mehrerer Stopkodons im Bereich der mitochondrialen Sequenzen ist eine Translation der AL-36 mRNA im Cytoplasma unwahrscheinlich.

Parallel zur Charakterisierung HBV spezifischer mRNAs wurden zelluläre Antigene der PLC/PRF/5 Zelllinie auf tumorspezifische Expression hin untersucht. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der gegen diese Zellen hergestellt wurde, konnte ein 43 kD großes, cytoplasmatisches Protein identifiziert werden (PLC-43), welches als ein tumorspezifisches Antigen der Klasse III klassifiziert wurde. Während die meisten der untersuchten normalen Gewebe und Zellen keine Expression des Antigens zeigten, wurde eine starke Expression in 80 % der untersuchten Tumorgewebe und -zellen unterschiedlichen Ursprungs gefunden. In animalen Zellen konnte durch Vergleich von Zellen vor und nach in vitro Transformation direkt ein Zusammenhang mit der malignen Entartung aufgezeigt werden. Die Expression des Antigens ist nicht auf Lebertumore beschränkt, sondern wurde auch in Tumoren anderen Ursprunges nachgewiesen. Im Vergleich HBV positiver und HBV negativer Hepatomzelllinien stellte sich heraus, daß die Expression des Antigens durch HBV erhöht werden

kann. Das entsprechende Gen stellt damit möglicherweise eine der Zielsequenzen für eine Transaktivierung durch ein HBV Genprodukt dar. Durch Mitosestimulierung normaler Zellen konnte einerseits gezeigt werden, daß eine geringe Menge von PLC-43 teilungsabhängig exprimiert werden kann. Andererseits konnte die Expressionsrate durch Differenzierung von PLC/PRF/5 Zellen mit Retinsäure deutlich reduziert werden. Bei PLC-43 handelt es sich damit um ein tumorspezifisches Antigen, welches in geringer Menge teilungsabhängig exprimiert werden kann, dessen konstitutive Überexpression jedoch an den voll malignen Zustand der Zelle gebunden ist.

Das Protein konnte mit Hilfe des spezifischen Antikörpers isoliert werden. Die Sequenzierung dreier tryptischer Peptide ergab eine 50 - 60 %ige Homologie zu verschiedenen pro- und eukaryotischen Elongationsfaktoren der Translation (EF-Tu bzw. EF1-alpha). Es ist anzunehmen, daß PLC-43 dieser Proteinfamilie angehört und entsprechende Funktionen ausübt.

B**EINLEITUNG**

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört weltweit zu den häufigsten Krebsarten; bis zu 2 % der Bevölkerung Asiens und Afrikas erkranken daran (Wolf, 1986). Die Entstehungsmechanismen sind nicht geklärt, ein kausaler Zusammenhang mit einer Hepatitis B Virus (HBV) Infektion ist jedoch wahrscheinlich. In Endemiegebieten (Ostasien und Zentralafrika) ist das Auftreten von Lebertumoren besonders hoch, und in Serien HCC erkrankter Patienten sind sehr häufig HBV Marker zu finden (Szmuness, 1978). Prospektive Studien deuten darauf hin, daß das Risiko, an HCC zu erkranken, bei einer chronischen Verlaufsform der HBV Infektion bis zu 200fach erhöht ist (Beasley, 1982). Nicht zuletzt wird die virale DNA in bis zu 90 % der HBsAg positiven Tumoren integriert im Wirtsgenom gefunden. Alle diese Fakten geben Anlaß dazu, den molekularen Mechanismus einer HBV assoziierten Karzinogenese näher zu untersuchen. Hierbei darf allerdings nicht außer acht gelassen werden, daß auch andere zelluläre oder exogene Faktoren eine Rolle in der Tumorgenese spielen können.

1. Die Gruppe der Hepadna Viren

Humane und animale Hepatitis B Viren werden aufgrund ihrer Ähnlichkeiten in Aufbau und Replikationsmechanismus in der Gruppe der Hepadna Viren zusammengefaßt. Es sind kleine, behüllte Viren mit einem partiell doppelsträngigen, zirkulären DNA Genom. Zu dieser Gruppe gehört neben dem humanen Hepatitis B Virus (HBV; Dane, 1970) das Marmeltier ("woodchuck") Hepatitis Virus (WHV; Summers, 1978), das Erdhörnchen ("ground squirrel") Hepatitis Virus (GSHV; Marion, 1980), das Enten ("duck") Hepatitis Virus (DHBV; Mason, 1980), das Eichhörnchen ("tree squirrel") Hepatitis Virus (Feitelson, 1986) und das erst vor kurzem beschriebene Graureiher ("heron") Hepatitis Virus (HeHBV; Sprengel, 1988). Charakteristisch für alle diese Viren ist ein enges Wirtsspektrum und ein relativer Hepatotropismus.

2. Aufbau des Hepatitis B Virus

Im Serum HBV infizierter Patienten werden drei verschiedene virusspezifische Partikel gefunden, von denen nur das kugelförmige, 42 nm große "Dane Partikel" infektiös ist (Dane, 1970). In großem Überschuß kommen filamentöse und sphärische Partikel von 16 - 25 nm Größe vor, welche aus Hüllprotein und zellulären Lipiden bestehen, aber keine Nukleinsäure enthalten.

Die Dane Partikel bestehen aus einer äußeren Hülle aus zellulären Lipiden und dem Hepatitis Oberflächenantigen ("Surface" Antigen, HBsAg) und dem Nukleokapsid von 27 nm Durchmesser, in welchem sich u.a. die virale Nukleinsäure befindet.

Das HBsAg besitzt drei antigene Determinanten: die in allen Subtypen gleiche Determinante a und zwei von vier möglichen Determinanten y oder d bzw. w oder r. Hauptsächlich werden die Serotypen adw, ayw und adr gefunden, wobei Kreuzimmunität besteht. Unterschiede in Infektiosität und Krankheitsverlauf bestehen nicht. Es werden drei unterschiedlich große Oberflächenantigene in der ca. 7 nm dicken Lipidhülle des Virus gefunden, welche von den drei in der S-Region lokalisierten Startkodons aus translatiert werden (vergl. 3.).

Das Nukleokapsid ist hexagonal, besteht aus 80 Molekülen des "Core" Antigens (HBcAg, P 22^c) und beinhaltet neben der Nukleinsäure eine endogene DNA Polymerase und eine Phosphokinase, welche P 22^c phosphorylieren kann (Albin, 1980). Das "Core" Antigen ist stark basisch und liegt daher eng mit der Nukleinsäure assoziiert vor (Tiollais, 1981). In infizierten Hepatozyten ist es hauptsächlich im Kern lokalisiert. Ein Spaltprodukt des HBcAg, das HBeAg, wird im Serum von Patienten gefunden.

3. Genomorganisation

Das HBV Genom besteht aus einem ca. 3,2 kb großen, partiell doppelsträngigen DNA Molekül (Abb. 1). Der lange L (-)-Strang ist nicht kovalent geschlossen, sondern ist bei Position 1814 unterbrochen ("Nick"). Am 5' Ende ist ein Protein kovalent gebunden (Gerlich, 1980), welches im 5' Teil des Polymeraseleserahmens kodiert ist (Schaller, pers. Mitteilung). Der kurze S (+)-Strang umfaßt nur 20 - 80 % der Länge des L(-)-Stranges, wobei das 5' Ende festgelegt und das 3' Ende variabel ist. Der Einzelstrangbereich wird als "gap" bezeichnet. Die zirkuläre Form des Moleküls wird durch Basenpaarung zwischen den 5' Enden des L (-)- und S (+)-Stranges (Position 1601 und 1826) aufrechterhalten (Will, 1987). Zwei direkte Sequenzwiederholungen von 11 bp ("direct repeats", DR1 und DR2) befinden sich bei den Positionen 1814 (DR1) und 1590 (DR2). Sie spielen bei der Replikation eine wichtige Rolle (4.).

Nach Klonierung des viralen Genoms und Bestimmung der Nukleinsäuresequenz (Ono, 1983, Pasek, 1979, Valenzuela, 1980) konnten auf dem L (-)-Strang vier große Leseraster identifiziert werden, welche mit S, C, P und X bezeichnet werden. Sie besitzen keine Introns und sind überlappend angeordnet, so daß alle drei Leseraster genutzt werden. Das S-Gen (Position 2848 - 833) ist in drei Abschnitte unterteilt: Die S-Region mit einem AUG Startkodon bei Position 155 kodiert für das Hauptoberflächenantigen, welches aus 226 Aminosäuren besteht und in einer nicht glykosylierten

Form mit einem Molekulargewicht von 24 kD ($p24^S$) und in einer glykosylierten Form mit einem Molekulargewicht von 27 kD vorkommt ($gp27^S$). $gp27^S$ ist in die Lipidmembran des Virus eingebettet. Die PreS2-Region mit Beginn bei Position 3172 kodiert für das mittlere

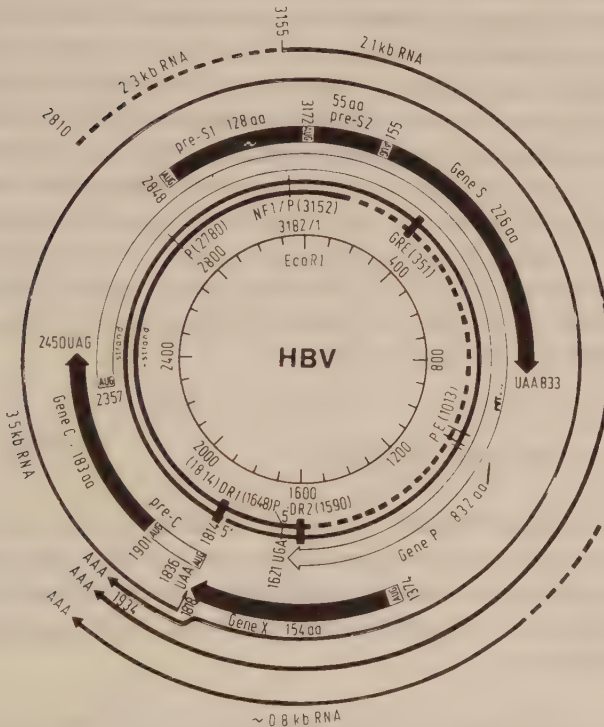


Abb. 1: Genomorganisation des Hepatitis B Virus (Subtyp adw)

Das zirkuläre, partiell doppelsträngige HBV Genom ist durch die durchgezogene Linie dargestellt, der Einzelstrangbereich variabler Länge ist gestrichelt wiedergegeben. Zur Orientierung ist die Basennummerierung des Genoms in dem inneren Kreis dargestellt, wobei die singuläre EcoRI Schnittstelle als Position 0 definiert ist. Die vier Leserahmen des L (-)-Stranges sind durch dicke Pfeile eingezeichnet, die Start- und Stopkodons sowie die Anzahl der Aminosäuren sind angegeben. Außerdem sind die Positionen der direkten Sequenzwiederholungen (DR1 und DR2), der Bindungsstelle des "nuclear factor I" (NFI), des Glucocorticoidrezeptorelementes (GRE), der Promotoren (P) und der Enhancer (E) sowie das Polyadenylierungssignal angegeben.

Oberflächenantigen, welches sich auf der Virusoberfläche befindet und in zwei unterschiedlich glykosylierten Formen zu finden ist (gp 33^s bzw. gp 36^s), und die PreS1-Region (Position 2842) für das große Oberflächenantigen, welches wie das Hauptantigen in einer glykosylierten und einer nicht glykosylierten Form vorliegen kann (p39^s bzw. gp42^s). Das C-Gen (Position 1836 - 2450) enthält ebenfalls eine PreC Region, welche für ein hydrophobes Protein kodiert. Das HBcAg wird von dem AUG Startkodon bei Position 1901 translatiert. Das P Gen, welches für die virale Polymerase kodiert, umfaßt ca. 3/4 des Genoms von Position 2357 - 1621. Dieser Leserahmen weist im C-terminalen Bereich eine Homologie der Aminosäuresequenz mit der Reversen Transkriptase der Retroviren auf. Dies legt nahe, daß auch die für die Replikation notwendige Reverse Transkriptase im P-Genbereich kodiert ist (Toh, 1983). Während die drei beschriebenen Leserahmen viralen Ursprunges sind, scheint das X Gen, welches bei Position 1374 beginnt und bei 1818 endet, ursprünglich zellulären Ursprunges zu sein (Miller, 1986), wie auf Grund der Präferenzen in der dritten Base von Kodons, die variieren kann, abgeleitet wurde. Das X-Protein kann eine transaktivierende Funktion auf verschiedene eukaryotische und virale Promotoren und Enhancer ausüben und könnte möglicherweise einen Einfluß auf die Deregulation der Genexpression in Tumorzellen (Wollersheim, 1987; Zahm, 1988) haben.

4. Infektion der Zellen und Replikation

HBV Partikel adsorbieren vermutlich an bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche von Hepatozyten, bevor sie durch Endozytose aufgenommen werden. Da sowohl Hepatozyten als auch die Viren (im N-terminalen Bereich des mittleren Oberflächenantigens) einen Rezeptor für humanes Polyserumalbumin (PHSA) besitzen, könnte PHSA die Bindung von HBV an Hepatozyten vermitteln (Machida, 1984).

Wahrscheinlich gibt es zusätzliche Mechanismen zur Aufnahme der Virionen in die Zelle, da HBV auch in verschiedenen anderen Geweben gefunden wurde (Brechot, 1984; Dejean, 1984a; Blum, 1983; Elfassi, 1984).

Nach dem Eindringen des Virus in die Zelle wird die virale DNA freigesetzt und der Einzelstrangbereich im Zellkern durch die virale Polymerase aufgefüllt. Dabei entsteht ein zirkuläres, kovalent geschlossenes DNA Molekül (ccc DNA; Miller, 1984). Dieses dient als Matrize für die Transkription der prägenomischen, 3,5 kb langen, terminal redundanten RNA durch die zelluläre RNA Polymerase II (Summers, 1982), welche in das Nukleokapsid verpackt wird. Durch reverse Transkription des Prägenoms, vermutlich durch die virale Polymerase, wird der L (-)-Strang synthetisiert, welcher im DR1 initiiert wird und eine terminale Redundanz von 8 bp aufweist. Als

"Primer" für die reverse Transkription dient das am 5' des L (-)-Stranges gebundene Protein (Gerlich, 1980). Gleichzeitig mit der Synthese des L (-)-Stranges wird durch eine RNase H Aktivität die RNA Matrize bis auf ein Oligoribonukleotid vom 5' Ende des Prägenoms (Bereich des DR1) abgebaut. Dieses Oligoribonukleotid hybridisiert an die DR2-Sequenz und initiiert dort die Synthese des S (+)-Stranges. Um eine Synthese über das 5' Ende des L (-)-Stranges ("Nick", Position 1826) hinaus zu ermöglichen, ist ein intramolekularer Matrizenwechsel erforderlich, welcher durch die terminale Redundanz des L (-)-Stranges ermöglicht wird. Bevor die Synthese des S (+)-Stranges vollständig ist, wird das Virion mit dem zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA Molekül aus der Zelle sezerniert. Die Vervollständigung des S (+)-Stranges findet erst nach erneuter Infektion einer Zelle statt. Der Ausschleusungsprozess des HBV erfolgt nicht über die äußere Zellmembran, sondern anscheinend ausschließlich über das endoplasmatische Retikulum (Patzner, 1986).

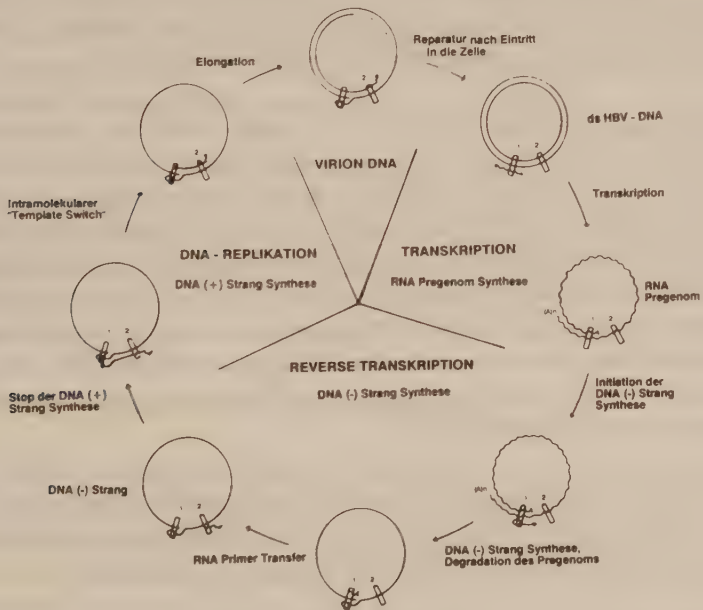


Abb. 2: Schematische Darstellung der Replikation des Hepatitis B Virus (nach Will, 1987)

5. Expression des HBV Genoms

Die meisten Erkenntnisse über die Expression und auch die Replikation des HBV Genoms stammen aus Untersuchungen an infizierten Schimpansenlebern und humanen Lebern sowie aus Experimenten mit animalen Hepadna Viren. Erst kürzlich gelang es, HBV in vitro zu propagieren (Sureau, 1986; Tsurimoto, 1987).

In vivo wurden hauptsächlich drei Spezies polyadenylierter RNA von 2,1, 2,3 und 3,5 kb Länge gefunden, welche verschiedene 5' Enden haben, aber am 3' Ende an der einzigen Polyadenylierungsstelle im HBV Genom enden (Position 1934; Cattaneo, 1984).

In mit HBV transfizierten Säugetierzellen konnte zusätzlich eine 0,8 kb große mRNA nachgewiesen werden. Ein Promotor in der 5' Region vor dem X-Gen steuert die Expression dieser X-spezifischen mRNA mit multiplen Initiationsstellen (Positionen 1225, 1280, 1300; Siddiqui, 1987).

Die 2,1 kb lange mRNA beginnt bei Position 3155. Sie umfaßt die preS2 Region, die S-Region und das X Gen und kodiert für das Hauptoberflächenantigen. Ihre Expression wird von dem SPII Promotor (CCTACTCC, Position 3133 - 3140) in der preS1 Region reguliert, welcher eine große Homologie zu dem späten SV40 Promotor aufweist (Cattaneo, 1983). Etwa 190 bp 5' des Promotors befindet sich eine Bindungsstelle für den "nuclear factor I" (NF1; Shaul, 1986), dessen Deletion eine verminderte Aktivität des SPII Promotors zur Folge hat. Der SPII Promotor unterliegt sowohl einer negativen als auch einer positiven Kontrolle: Ein negatives regulatorisches Element in der Region -48 bis -103 ist in Nicht-Leber-Geweben aktiv, während ein stimulierender Faktor aus Leberzellen an die Region -27 bis +35 bindet. Möglicherweise kommt dieser Region auch eine zellspezifische Enhancerfunktion zu (De-Medina, 1988).

Die Expression der 2,3 kb langen mRNA, deren 5' Ende bei Position 2810 lokalisiert ist und welche für das große Oberflächenantigen kodiert, wird von dem einer Hogness-Box entsprechenden SPI Promotor (TATAAG, Position 2751 - 2756) reguliert (Pourcel, 1982, Rall, 1983).

Die 3,5 kb lange, terminal redundante mRNA kodiert für das "Core" Antigen und beginnt bei Position 1818. Sie dient auch als Matrize für die Synthese des L (-)-Stranges bei der Replikation und wird als Prägenom bezeichnet. Ihre Expression wird von dem HBc Promotor kontrolliert, welcher eine TATA ähnliche Sequenz besitzt (TACATAAG, Position 1651 - 1658; Rall, 1983). Dieser Promotor steht unter der Kontrolle des zwischen der X- und S-Region lokalisierten HBV-Enhancers (Position 1000 - 1250; Tognoni, 1985; Shaul, 1985). An diesen Enhancer binden leberspezifische Faktoren, die seine Aktivität regulieren (Chou, 1988). Hierin liegt ein Grund für den relativen

Hepatotropismus des HBV, da die Synthese des Prägenoms in anderen Geweben weniger effizient ist. Dieser Enhancer kann auch die Aktivität des S-Promotors stimulieren.

Die 3,5 kb lange mRNA ist die einzige, welche den Polymeraseleserahmen in voller Länge enthält. Wahrscheinlich wird zunächst ein Core-Polymerase-Fusionsprotein translatiert, welches durch eine ribosomale Rasterverschiebung entstehen kann (Weimer, pers. Mitteilung). Nach Verpackung in das Virus wird das Fusionsprotein proteolytisch gespalten und dadurch die aktive Polymerase freigesetzt (Bavand, 1988). Die Untersuchungen von Bavand belegen auch die reverse Transkriptaseaktivität der viralen Polymerase. Die für die Abspaltung nötige Proteaseaktivität könnte im aminoterminalen Bereich des Core Antigens kodiert sein (Miller, 1987); sie bewirkt auch die Abspaltung des e-Antigens vom Core Antigen. Im N-terminalen Bereich des Polymeraseleserahmens ist das am 5' Ende des L (-)-Stranges kovalent gebundene Protein kodiert, welches im Zuge der Virusreifung ebenfalls proteolytisch vom Vorläuferprotein abgespalten wird (Bartenschlager, pers. Mitteilung). Die Expression des P-Proteins in vivo konnte indirekt durch den Nachweis von anti HBp Antikörpern in Seren von infizierten Patienten gezeigt werden (Stemler, 1988).

Als weitere regulatorische Sequenz befindet sich eine Glucocorticoid-Rezeptorsequenz (GRE) im Bereich des S-Gens (Position 351 - 366). Falls an diese Sequenz auch andere Steroidhormone, wie z.B. Sexualhormone, binden können, könnte sie dafür verantwortlich sein, daß ca. 6 mal soviel Männer wie Frauen an Hepatitis B erkranken und ein HCC entwickeln (Beasley, 1984; Tur-Kaspa, 1986).

6. Verlaufsformen einer Hepatitis B Virus Infektion

Etwa 80 % aller HBV Infektionen verlaufen klinisch inapparent, nur 20 % werden akut. 1 % davon führt nach einem fulminanten Verlauf nach wenigen Tagen oder Wochen zum Tod des Patienten. 90 - 95 % aller Patienten können das Virus innerhalb eines halben Jahres völlig eliminieren und erwerben eine lebenslange Immunität, während 5 - 10 % chronisch mit dem Virus infiziert bleiben. Bei 5 - 20 % dieser Patienten treten keine Symptome auf, der einzige serologische Hinweis auf eine bestehende HBV Infektion ist der Nachweis des HBsAg im Serum dieser Patienten. Sie werden als gesunde Virusträger ("healthy carriers") bezeichnet.

Die chronische Hepatitis kann in zwei Formen verlaufen: Als chronisch persistente Hepatitis (70 %) mit lymphozytären Infiltraten der Periportalfelder, und als chronisch aktive Hepatitis (30 %), bei der das lymphozytäre Infiltrat über die Periportalfelder hinausgeht. 10 % der chronisch persistenten Infektionen gehen in eine chronisch aktive Verlaufsform über. Über 50 % der chronisch aktiv

infizierten Patienten entwickeln eine Leberzirrhose, welche in 4 - 15 % zur Entwicklung eines HCC führt. 1 % der chronisch aktiven Hepatitiden gehen unter Umgehung des Zirrhosestadiums direkt in ein HCC über. Die Latenzzeit zwischen der HBV Infektion und der Entwicklung eines HCC beträgt bis zu 20 Jahre.

Die unterschiedlichen Verlaufsformen der HBV Infektion bis zur Ausbildung einer HCCs sind in Abb. 3 zusammengefaßt.

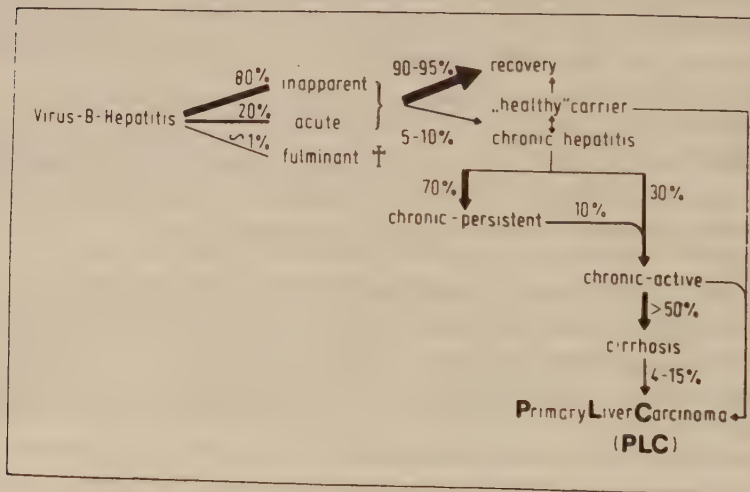


Abb. 3: Verlaufsformen einer Hepatitis B Virus Infektion

Auf molekularer Ebene unterscheidet man zwei Phasen der HBV Infektion: Eine frühe, permissive Phase, die durch Virusreplikation gekennzeichnet ist, und eine späte, nicht permissive Phase, in der das Virus nicht mehr repliziert, sondern integriert in der Wirts-DNA vorliegt.

Der Infektionsverlauf wird von einer Reihe zellulärer, immunologischer und exogener Faktoren beeinflusst. So konnte gezeigt werden, daß der DHBV Titer nach Aflatoxin B₁ Intoxikation in infizierten Entenlebern stark ansteigt (Uchida, 1988). Desweiteren ist das Risiko bei Afrikanern und Asiaten, an einem HCC zu erkranken, gegenüber anderen Rassen erhöht (Szmunn, 1978). Man nimmt daher an, daß die genetische Situation eines Individuum den Infektionsverlauf beeinflussen kann. Auch unterschiedliche Immunreaktionen können eine Rolle spielen. Untersuchungen an immunsupprimierten Patienten zeigten, daß hier oft eine wenig aktive Form der Hepatitis trotz hoher

HBsAg Titer vorliegt (Rustgiv, 1984). Es wurde daraus geschlossen, daß die Infektion selber nicht lytisch ist, sondern die Zellyse durch zytotoxische T-Lymphozyten verursacht wird. Als virales Zielprotein für die Erkennung durch den T-Zellrezeptor wurde das HBcAg identifiziert, welches in geringer Konzentration auch auf der Oberfläche infizierter Hepatozyten exprimiert ist (Pignatelli, 1987). Dieses virale "Target" wird nur in Verbindung mit einer erhöhten HLA Expression erkannt. Bei einer gestörten HLA Expression könnte somit die Elimination infizierter Hepatozyten ineffizienter sein. Man kann außerdem davon ausgehen, daß auch hormonelle Einflüsse die maligne Entartung fördern können, da männliche Patienten mit einer HBV Infektion 3 - 6mal häufiger ein HCC entwickeln als weibliche Patienten (Beasley, 1984).

Durch die Integration der Virus DNA in das Wirtsgenom in der späten, nicht permissiven Phase wird in aller Regel das HBc Gen zerstört oder seine Expression unterdrückt. Diese Zellen werden offenbar vom Immunsystem nicht mehr erkannt und daher nicht eliminiert. Diese Phase entspricht der Initiation der Onkogenese. Durch entzündliche Prozesse oder Nekrosen kann es zu vermehrten Mitosen kommen. In diesem Stadium kann die virale wie auch zelluläre DNA rearrangieren (Popper, 1987) und die Expression zellulärer Proteine könnte dereguliert sein, wodurch möglicherweise eine Immortalisierung und/oder Transformation der Zelle im Sinne einer Tumorpromotion bewirkt wird. Kommt es dann zu einer klonalen Expansion einer solchen Zelle, könnte ein HCC entstehen.

Ob die Integration der HBV DNA allein ausreichend ist, um eine Leberzelle zu transformieren oder auch nur zu immortalisieren, kann nicht mit letzter Gewißheit beantwortet werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß im Sinne einer multifaktoriellen Onkogenese die oben angeführten Faktoren eine entscheidende Rolle spielen.

7. Struktur integrierter HBV DNA in primären Leberzellkarzinomen

In vielen HCCs wird HBV DNA integriert im Wirtsgenom gefunden (Brechot, 1980; Chakraborty, 1980; Edman, 1980; Koshy, 1981). Auch in Leberzirrhosen, welche in vielen Fällen einer Tumorentwicklung vorausgehen, wurden HBV DNA Integrationen gefunden (Koshy, 1981), jedoch sind die HBV positiven Zellen hier im Gegensatz zum Tumor in der Regel nicht klonal. Neben den epidemiologischen Daten und der Tatsache, daß im Tiermodell nach einer chronischen Infektion mit Hepadna Viren Lebertumore mit hoher Inzidenz entstehen können (100 % aller infizierten Marmeltiere entwickeln zwei Jahre nach Infektionen ein HCC; Chen, 1986), ist dies der stärkste Hinweis darauf, daß HBV eine kausale Rolle bei der Entstehung des HCCs spielen könnte. Die HBV Integrate in Tumoren und in Tumorzelllinien wurden daher eingehend charakterisiert (Twist,

1981; Koch, 1984a; Koch, 1984b; Shaul, 1984; Ziemer, 1985; Hino, 1986; Fowler, 1986; Nagaya, 1987, Übersichtsartikel).

Bei detaillierten Untersuchungen konnte jedoch kein genereller Mechanismus für die HBV Integration gefunden werden. Die Integration der viralen DNA erfolgt an unspezifischen Stellen im Wirtsgenom. Präferenzielle Integrationssequenzen konnten nicht gefunden werden. Auch extensive Sequenzhomologien zwischen viraler und flankierender Wirts-DNA wurden nicht gefunden, kürzere homologe Abschnitte von 10 - 13 bp in der viralen und der flankierenden zellulären DNA wurden jedoch beschrieben (Koch, 1984a). Durch die Integration kommt es häufig zu großen Deletionen und Rearrangements der zellulären DNA und zu Chromosomentranslokationen (Koch, 1984a; Koch 1984b; Hino, 1986; Meyer, 1988).

Auch die integrierten viralen Sequenzen weisen große Unterschiede auf:

1. Die virale DNA ist oft - im Gegensatz zu integrierten animalen Hepadna Virus Sequenzen - kolinear mit dem HBV Genom, kann aber auch durch Duplikationen, Deletion oder interne Rearrangements mehr oder weniger stark verändert sein (Koike, 1983; Mizusawa, 1985; Nagaya, 1987; Tokino, 1987).
2. Die meisten Integrate sind von subgenomischer Länge, jedoch kann die integrierte DNA auch aus HBV Dimeren oder Multimeren bestehen (Fowler, 1986; Tokino, 1987; Nagaya, 1987).
3. Relativ häufig liegt das 3' Ende der viralen Sequenzen in oder nahe den "direct repeats" (DR) oder auch im gap Bereich (Dejean, 1984b; Koshy, 1983; Nagaya, 1987).
4. Die Integration zwischen DR1 und DR2 bewirkt, daß das X-Gen häufig 3' trunziert ist und das C-Gen fehlt. Das S-Gen ist meistens funktionsfähig, wie durch die Fähigkeit vieler HBV positiver Zelllinien, das HBsAg zu synthetisieren, gezeigt werden konnte. In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, daß häufig auch das X-Gen, obwohl trunziert, funktionell intakt ist. (Wollersheim, 1988).

Die unterschiedlichen Strukturen der integrierten HBV DNA sowie der flankierenden zellulären DNA lassen keinen Schluß auf einen Mechanismus einer HBV assoziierten Karzinogenese im Sinne eines "cis"-Mechanismus zu.

8. Modelle einer HBV induzierten Karzinogenese

Für eine HBV assoziierte Onkogenese sind verschiedene genetische Mechanismen der malignen Transformation denkbar, für die es jeweils Beispiele aus anderen viral induzierten Tumoren gibt. Man unterscheidet direkte und indirekte Mechanismen, die in "cis", also entlang eines DNA Moleküles, oder "trans" wirken können.

8.1

Insertionelle Mutagenese

Bei einer insertionellen Mutagenese, welche stets in "cis" wirkt, kann erstens durch die Integration eines viralen Promotors und/oder Enhancers die Expression zellulärer Gene direkt beeinflußt werden. Dabei kann es durch die erhöhte Expression zellulärer Onkogene zu einer malignen Transformation der Zelle kommen. Dieser Mechanismus konnte für einige Retroviren wie das Avian Leukosis Virus (ALV; Hayward, 1981) oder das Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV; Nusse, 1982) gezeigt werden.

Zweitens kann ein zelluläres Gen, welches für die Aufrechterhaltung des "normalen" Zustandes der Zelle notwendig ist, durch die virale Integration zerstört oder deletiert werden. Einige Tumore wie Retinoblastom (Caveane, 1985), Wilms Tumor (Orkin, 1984) oder Osteosarkom (Hansen, 1985) zeigen eine solche Inaktivierung zellulärer Anti-Onkogene. Allerdings ist bisher nicht nachgewiesen worden, daß hier eine virale Insertion vorliegen kann. Solche Mutationen sind rezessiv, so daß es eine Voraussetzung für die Entstehung eines Tumors ist, daß das andere Allel dieses Genes schon vor der viralen Integration defekt war.

Eine insertionelle Mutagenese als allgemeiner Mechanismus für eine HBV assoziierte Karzinogenese würde voraussetzen, daß die Integration in den meisten Tumoren an der gleichen Stelle im Wirtsgenom erfolgt, oder immer benachbart zu verschiedenen zellulären Onkogenen stattfindet. Bisher konnte jedoch nur in einem einzigen Fall gezeigt werden, daß HBV in der Nähe einer zu einem bekannten Onkogen homologen Sequenz integriert ist (erbA, Dejean, 1986). Auch bisher unbekannte Onkogene scheinen nicht in der unmittelbaren oder mittelbaren Nähe der integrierten HBV Sequenzen zu liegen, wie durch Transfektion von 19,5 kb 5' flankierenden und 31 kb 3' flankierenden zellulären Sequenzen der Hepatomzelllinie huH4 gezeigt werden konnte (Duelli, 1988). Dieser Mechanismus ist für HBV daher eher unwahrscheinlich.

8.2

Direkte Onkogenese

Damit ein Virus direkt onkogen wirken kann, muß es ein eigenes Onkogen tragen, welches ohne weitere Faktoren die maligne Transformation einer Zelle bewirken kann (Bishop, 1985, Übersichtsartikel). Beispiele hierfür sind das T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) oder das v-src Onkogen des Rous Sarkom Virus (RSV). Im HBV Genom wurde mit den klassischen Nachweismethoden für Onkogene kein transformierendes Gen identifiziert. Dieser Mechanismus ist

für eine HBV assoziierte Karzinogenese auch deshalb unwahrscheinlich, da die Latenzzeit von der Infektion bis zur Ausbildung eines Lebertumors bis zu 20 Jahren betragen kann und die direkte Transformation durch ein virales Onkogen ein relativ schneller Prozess ist.

8.3 Indirekte Onkogenese

In diesem Modell trägt ein virales Protein oder eine RNA indirekt zu einer veränderten Expression verschiedener zellulärer Proteine bei, die ihrerseits die maligne Transformation der Zelle bewirken. Dieser Mechanismus wird als "Transaktivierung" bezeichnet und ist unabhängig vom Ort der viralen Integration. Er kann allein oder zusätzlich zu anderen Mechanismen für die Tumorentwicklung verantwortlich sein. Er wurde für das humane T-Zell Lymphotrope Virus (HTLV-I; Sodroski, 1984), Visna Viren (Hess, 1985), SV40 (Sassone-Corsi, 1985), Adenovirus (Stein, 1984), Rinderpapillomvirus (BPV; Luský, 1985) und Herpes Viren (El Kareh, 1985) beschrieben.

Um dieses Modell auf die HBV-assozierte Karzinogenese übertragen zu können, sollen im Folgenden zunächst die in HBV positiven Hepatomen exprimierte HBV Sequenzen beschrieben werden.

Während die Expressionsrate der HBV spezifischen mRNAs während der Replikation relativ hoch ist, werden die integrierten HBV Sequenzen in wesentlich geringerem Maße exprimiert (Imazeki, 1987). Dennoch ist es möglich, daß das onkogene Potential des HBV, im Gegensatz zur insertionellen Mutagenese, welche eine Expression nicht voraussetzt, durch ein Genprodukt wirksam wird. Eine Diskussion über den Mechanismus einer HBV assoziierten Onkogenese setzt insofern die Kenntnis der Struktur und Funktion der Expressionsprodukte der HBV Integrate voraus.

C-spezifische mRNAs fehlen in Tumoren fast immer (Imazeki, 1987; Su, 1986; Ou, 1985). Häufig beruht das darauf, daß das C-Gen im integrierten Zustand nicht mehr intakt ist. Aber auch bei vollständiger Integration des C-Genes fehlen fast immer die entsprechenden Transkripte in den Tumoren. Dies kann in einigen Fällen darauf zurückzuführen sein, daß Bereiche der integrierten HBV DNA in den Tumoren methyliert sind und damit eine Expression von diesen Sequenzen nicht möglich ist (Chen, 1988). Wie bereits dargelegt (6.), ist das Fehlen des HBcAg Voraussetzung dafür, daß eine persistent infizierte Zelle der Elimination durch das Immunsystem entgehen kann.

Die meisten HBV spezifischen mRNA aus Tumoren haben PreS-, S- und X-Spezifität; häufig werden Fusionstranskripte mit zellulären Sequenzen gebildet (Ou, 1985; Freytag von Loringhoven, 1985; Su, 1986; Debelka, 1988). Die Kotranskription von 3' flankierenden zellulären Sequenzen könnte zur

Stabilisierung der mRNAs beitragen und so zu einer erhöhten Expression des Proteins führen (Freytag von Loringhoven, 1985; Wollersheim, 1988). Es liegt nahe, daß eine Rolle des HBV bei der Karzinogenese einer dieser exprimierten viralen Sequenzen zuzuschreiben ist, jedoch konnte noch in keinem Fall eine transformierende Eigenschaft einer klonierten HBV-spezifischen mRNA nachgewiesen werden.

Da der HBx Leserahmen im HBV Genom an einer Position gelegen ist, welche homolog zu der Position der transaktivierenden Gene in HTLV-Viren ist, wurde das HBx Genprodukt auf eine transaktivierende Funktion hin untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Expression von Genen unter der Kontrolle verschiedener eukaryotischer und viraler Promotoren und Enhancer durch das HBx Genprodukt gesteigert werden kann (Siddiqui, 1987; Wollersheim, 1987; Wollersheim, 1988; Zahm, 1988). Diese Funktion bleibt nach viraler Integration in Tumoren enthalten, auch wenn der X-Leserahmen trunziert ist (Debelka, 1988; Wollersheim, 1988). Die Expression einer Hybrid-mRNA mit zellulär-flankierenden Sequenzen kann die transaktivierende Potenz des Protein deutlich erhöhen (Wollersheim, 1988). Neben dem HBx Gen können möglicherweise auch andere virale Genabschnitte wie z.B. die preS-Region, eine transaktivierende Funktion ausüben (Duelli, 1988; Meyer, 1988). Da eine Transaktivierung in der Regel nicht direkt zu einer malignen Transformation der Zelle, sondern zu einer Deregulation zellulärer Proteine führt, kann die maligne Entartung ein lang währender Prozess sein und die lange Latenzzeit bis zur Entwicklung eines HCC erklären. Für das tat Genprodukt des HTLVI, welches wie das X-Gen des HBV eine transaktivierende Funktion besitzt, konnte das transformierende Potential direkt nachgewiesen werden: Transgene Mäuse, welche das tat-Gen unter der Kontrolle des HTLVI-LTR enthielten, entwickelten 13 - 17 Wochen nach der Geburt mesenchymale Tumore (Nerenberg, 1987). Das Beispiel der durch HTLVI hervorgerufenen T-Zell-Leukämie weist deutliche Parallelen zu einem HBV induzierten Hepatom auf: Neben der langen Latenzzeit von bis zu 20 Jahren ist auch hier die maligne Entartung unabhängig vom Ort der viralen Integration. Ob und welche Rolle dieser Mechanismus tatsächlich bei der HBV induzierten Karzinogenese spielt, muß noch geklärt werden.

Eine indirekte Onkogenese liegt ebenfalls dann vor, wenn die HBV Integration sekundär zu Chromosomenbrüchen und Rearrangements innerhalb der zellulären DNA führt. Sind von diesen Rearrangements Onkogene betroffen, kann es zu der Entwicklung eines Tumors kommen. Für WHV induzierte Marmosetierhepatome konnte gezeigt werden, daß nach WHV Integration Rearrangements 5' des c-myc Genes oder in dessen erstem Intron auftreten können, wobei eine insertionelle Mutagenese durch WHV ausgeschlossen werden konnte. Die c-myc Expression war in diesen Tumoren erhöht (Möröy, 1986). In humanen Hepatomen wurde ein ähnlicher Mechanismus bislang nicht nachgewiesen.

9. Spezifische Veränderungen in der Antigenexpression einer Tumorzelle

Sollte durch die HBV Integration und die damit verbundene Transaktivierung die Expression zellulärer Gene dereguliert werden, müßte sich in Lebertumorzellen die vermehrte oder de novo Expression zellulärer Proteine nachweisen lassen. Die Expression hepatomspezifischer Proteine wurde wiederholt beschrieben (Wilson, 1983; Carlson, 1985; Shouval, 1985; Hu, 1986; Wiedmann, 1987), jedoch konnte ein Zusammenhang mit einer HBV Integration bisher nicht gezeigt werden.

Auch für eine Anzahl anderer Tumoren wurde die erhöhte Expression zellulärer Proteine beschrieben. Sie werden in der Regel als "tumorspezifische Antigene" bezeichnet, wobei das Ausmaß der Spezifität allerdings variiert. Man teilt die tumorspezifischen Antigene deshalb in drei Gruppen ein:

Als Klasse I Antigen bezeichnet man ein Protein, welches nur in einem individuellen Tumor exprimiert wird, nicht jedoch in anderen Tumoren gleichen oder unterschiedlichen Ursprungs oder in normalen Geweben. Diese Proteine werden auch als Tumortransplantationsantigene bezeichnet, da sie eine Immunität gegen den entsprechenden Tumor in syngenischen Mäusen hervorrufen (Old, 1981, Übersichtsartikel). Solche Antigene wurden z.B. in durch UV-Strahlung induzierten Mäusetumoren beobachtet (Stauss, 1986). Mäuse, die mit diesen Antigenen immunisiert worden waren, stießen den entsprechenden transplantierten Tumor ab. Es stellte sich heraus, daß es sich um de novo exprimierte MHC Klasse I Antigene handelte. Diese Antigene waren spezifisch für einen individuellen UV induzierten Tumor; andere UV induzierte Tumore im gleichen Mäusestamm exprimierten andere Antigene.

Viele tumorspezifische Antigene gehören der Klasse II an. In dieser Klasse faßt man Antigene zusammen, die in Tumoren gleichen und unterschiedlichen Ursprungs, jedoch nicht in normalen Geweben gefunden werden. Hierzu gehören einige Onkogenprodukte, die im Zuge der malignen Transformation in verschiedenen Tumoren exprimiert werden.

Bei der Untersuchung vieler normaler und maligner Gewebeproben stellte sich häufig heraus, daß ein ursprünglich als tumor"spezifisch" im engeren Sinne des Wortes bezeichnetes Protein in Wirklichkeit auch in normalem und/oder embryonalen Gewebe vorkommt (Old, 1981). Diese Antigene werden als Klasse III Antigene bezeichnet. Häufig sind sie in Tumoren stark überexprimiert und die verwendeten Nachweismethoden waren zunächst nicht sensitiv genug, um die meist geringen Mengen des Proteins in gesundem Gewebe nachzuweisen. In anderen Fällen war eine vergleichbar starke Expression in Tumoren und einem oder wenigen anderen Geweben zu finden.

Ein Beispiel hierfür ist das Antigen BLCa, welches in verschiedenen Tumoren und in B-Lymphozyten exprimiert wird (Chan, 1985).

Zur Identifizierung tumorspezifischer Antigene können monoklonale Antikörper der Maus (Köhler, 1975) gegen Tumorzellen gewonnen werden, die dann auf ihre Spezifität an einer Anzahl von Gewebeproben mit verschiedenen immunologischen Nachweismethoden überprüft werden. In der Medizin verspricht man sich von Antikörpern, die spezifisch mit Tumoren reagieren, eine Tumorklassifikation *in vivo*, die zu diagnostischen Zwecken genutzt werden könnte. Außerdem hofft man, durch Kopplung von Zytostatika an tumorspezifische Antikörper die Erfolge in der Chemotherapie zu verbessern (Reisfeld, 1987, Übersichtsartikel). So ist es beispielsweise gelungen, mit einem gegen ein proliferations-assoziiertes Oberflächenantigen aus einer Blasen-tumorzelllinie gerichteten Antikörper das Tumorzellwachstum *in vitro* zu hemmen (Yagita, 1986).

Viele medizinisch-diagnostisch ausgerichtete Untersuchungen geben nur wenig Aufschluß über die Funktion der tumorspezifischen Antigene in der Zelle und nur wenige wurden eingehend charakterisiert. Am detailliertesten untersucht sind die tumorspezifischen Antigene von Melanomen. Dieses System bot die Möglichkeit, einzelne Schritte der malignen Transformation vom normalen Melanozyten, gutartigen Läsionen, Präkanzerosen bis hin zu malignen Tumoren zu verfolgen (Koprowski, 1985, Übersichtsartikel; Reisfeld, 1987, Übersichtsartikel), jedoch ist es auch hier bis heute nicht gelungen, den Weg der malignen Transformation nachzuvollziehen. Näher charakterisiert wurde das Membranprotein gp97 aus Melanomen, welches eine auffallende Homologie zu Transferrin besitzt und daher als Melanotransferrin bezeichnet wird (Brown, 1982; Rose, 1986). Ob es in den Melanomen eine Transferrin ähnliche Funktion ausübt und ob diese Funktion für die Tumorentstehung nötig ist, ist unbekannt.

Ein zweites, gut charakterisiertes Tumorantigen ist das p53 (Rotter, 1985, Übersichtsartikel), welches in allen voll transformierten Zellen stark überexprimiert ist. p53 ist kausal an der malignen Entartung der Zellen beteiligt, da die p53 cDNA Zellen transformieren kann. p53 kann damit als zelluläres Onkogen bezeichnet werden.

Auch eine Reihe tumorassoziierten Antigene aus Hepatomen wurden mit einem ähnlichen Ansatz identifiziert. Die meisten dieser Antikörper sind gegen die HBV positive Hepatomzelllinie PLC/PRF/5 gerichtet (Shouval, 1985; Wiedmann, 1987; Carlson, 1985), aber auch andere Hepatomzelllinien (Focus, Wilson, 1988; Hep 3B, Hu, 1986) wurden verwendet. Es wurden mindestens 17 verschiedene monoklonale Antikörper beschrieben, von denen 16 Zelloberflächenantigene unterschiedlichen Molekulargewichtes erkennen, ein Antikörper erkennt ein cytoplasmatisches Antigen. Das cytoplasmatische Antigen konnte nicht näher charakterisiert

werden, da es sich nicht präzipitieren ließ und vermutlich kein Protein ist (Carlson, 1985). Mit einem monoklonalen Antikörper gegen ein 50 kD großes Membranprotein ist es gelungen, einen PLC/PRF/5 Tumor in der Maus zu lokalisieren (Carlson, 1985). Zwei der identifizierten monoklonalen Antikörper reagierten nur mit der immunisierenden Zelllinie (Wiedmann, 1987), sind also Klasse I Antigene. Drei Antigene gehören der Klasse III an, da sie in geringer Menge auch auf normalen Zellen exprimiert werden. Die meisten sind Klasse II Antigene, wobei sie relativ spezifisch für Lebertumore waren.

Es besteht die Möglichkeit, daß die Expression der hepatomspezifischen Antigene durch ein HBV Integrat in "trans" aktiviert werden kann, jedoch konnte das bisher in keinem Fall gezeigt werden. Über die Funktion dieser Antigene in der Zelle ist nichts bekannt. Lediglich auf Grund ihrer Lokalisation vermutet man, daß die Zelloberflächenantigene eine Funktion in der Informationsvermittlung oder im Zell-Zell-Kontakt ausüben. Ob dies einen Einfluß auf die Onkogenese hat, bleibt zu zeigen.

10. Problemstellung

Nach wie vor ist der Mechanismus, durch den HBV zur Onkogenese beitragen kann, unklar. Zu Beginn dieser Arbeit waren viele HBV Integrate aus humanen Hepatomzelllinien eingehend charakterisiert, jedoch konnte allein aufgrund des Integrationsmusters deren Bedeutung für die Tumorentstehung nicht erklärt werden. Über die Funktion der Transkripte dieser Integrate ist bislang wenig bekannt. Es ist jedoch möglich, daß durch die Expression der Integrate die zelluläre Genexpression beeinflußt werden kann und es so durch einen indirekten Einfluß des HBV zur malignen Entartung kommt.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher Transkripte von integrierten HBV Sequenzen, insbesondere viral-zelluläre Fusionstranskripte, charakterisiert werden, um sie bereits charakterisierten Integraten zuordnen zu können und eventuell Aussagen über eine Funktion in der Onkogenese machen zu können.

Für diese Untersuchungen wurde die PLC/PRF/5 Zelllinie verwendet, da sie die am besten charakterisierte, humane HBV positive Hepatomlinie ist. Sie enthält mindestens sieben verschiedene HBV Integrate des Subtyps adw, die kloniert und charakterisiert wurden (Koch, 1984; Ziemer, 1985). Alle Integrate enthalten Sequenzen aus dem S-Genbereich, fünf enthalten zusätzlich X-Gensequenzen und zwei enthalten C-Gensequenzen. Mindestens zwei der Integrate, Al10.5 AL10.7, enthalten funktionell intakte S-Gensequenzen, da das HBsAg von diesem Integrat exprimiert wird (Freytag von Loringhoven, 1985). Ein transaktivierender Einfluß eines Expressionsproduktes von

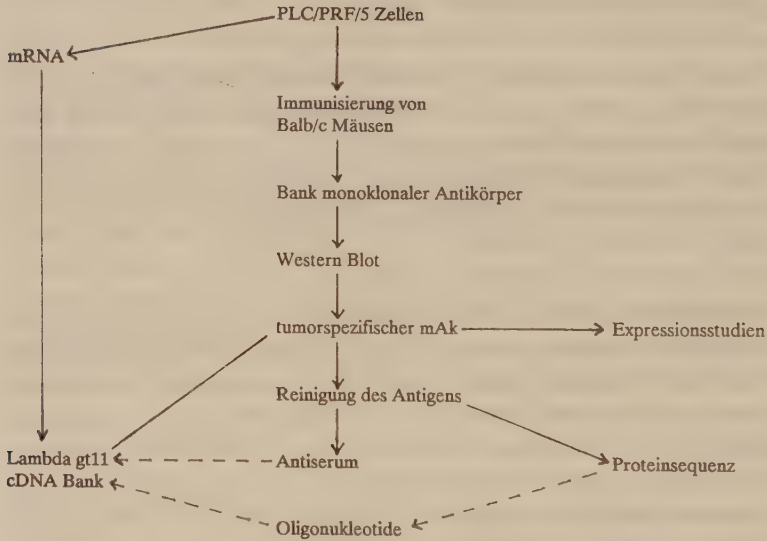
AL10.7 auf den frühen SV40 Promotor konnte nachgewiesen werden (Wollersheim, 1987). Ou und Rutter (1985) klonierten sieben cDNAs aus dieser Zelllinie, deren mRNAs vermutlich von dem gleichen Integrat (Klon 26, Ziemer, 1985; Klon AL10.5 oder AL10.7, Koch, 1984) transkribiert wurden.

Um weitere HBV spezifische mRNAs zu klonieren, sollten eine cDNA Bank ausgehend von PLC/PRF/5 Poly A⁺-RNA hergestellt und HBV haltige cDNAs identifiziert werden. Durch Restriktionskartierung und Sequenzierung sowie durch Southern und Northern Analyse zellulärer DNA und RNA sollten die cDNA-Sequenzen analysiert werden. Ziel dieser Untersuchung sollte die Klärung eines möglichen transformierenden Potentials dieser mRNAs sein.

Da die Deregulation der Expression zellulärer Proteine, sei es durch den Einfluß integrierter und exprimierter HBV Sequenzen oder unabhängig davon, bei der Hepatokarzinogenese möglicherweise eine entscheidende Rolle spielt, sollten im zweiten Teil der Arbeit monoklonale Antikörper gegen PLC/PRF/5 Proteine hergestellt werden, um eventuell Aussagen über ein dadurch identifiziertes tumorspezifisches Antigen in der Onkogenese machen zu können. Da die Spezifität der mit diesem Ansatz herzustellenden Antikörper dem Zufall überlassen ist, bestand die Möglichkeit, mit einem der Antikörper entweder das Produkt einer transaktivierenden und möglicherweise auch transformierenden HBV spezifischen mRNA zu erkennen, oder aber das Translationsprodukt einer HBV abhängigen Transaktivierung.

Auch für diese Untersuchungen wurde die PLC/PRF/5 Zelle gewählt, um möglicherweise die Expression bestimmter Proteine als eine Konsequenz der HBV Expression untersuchen zu können.

In der folgenden Skizze ist schematisch dargestellt, welche Versuche zur Charakterisierung eines tumorspezifischen Antigens unternommen wurden.



Es sollten monoklonale Antikörper isoliert werden, mit deren Hilfe ein oder mehrere tumorspezifische Antigene charakterisiert und das Expressionsmuster in einer Anzahl von verwandten und nicht verwandten Tumoren und normalen Geweben untersucht werden kann. Durch den Vergleich HBV positiver und HBV negativer Hepatomzelllinien sollte versucht werden, eine Aussage darüber zu machen, ob eine erhöhte Expression des Antigen durch HBV Integrate stimuliert werden kann. Weitere Versuche sollten die Expression des Antigens mit verschiedenen Stadien der malignen Entartung korrelieren. Mit Hilfe des Antikörpers sollte außerdem versucht werden, das Antigen zu isolieren, die entsprechende cDNA zu klonieren und auf ein mögliches onkogenes Potential hin zu untersuchen.

C ERGEBNISSE

1. KLONIERUNG HBV SPEZIFISCHER mRNAs AUS DER HUMANEN HEPATOMZELLINIE PLC/PRF/5

Ziel des ersten Teiles dieser Arbeit war es, HBV spezifische mRNAs aus der HBV positiven Hepatomzelllinie PLC/PRF/5 zu klonieren und zu charakterisieren. Durch Aufklärung der Struktur dieser mRNAs und durch Identifizierung der transkribierten HBV Sequenzen und der flankierenden zellulären Sequenzen sollten Einblicke in eine mögliche Bedeutung dieser Transkripte für die HBV induzierte Onkogenese gewonnen werden.

Die PLC/PRF/5 Zelllinie enthält zwei unterschiedlich große HBV hybridisierende, polyadenylierte Transkripte von 2,6 und 2,0 kb, wobei die 2,0 kb großen Transkripte in deutlich höherer Menge in der Zelle vorliegen als die 2,6 kb großen (Ou, 1985 und Abb. 4).

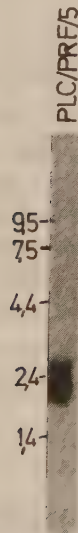


Abb. 4: Northern Blot Analyse HBV spezifischer mRNA der PLC/PRF/5 Zelllinie

2 μ g PolyA⁺-RNA aus PLC/PRF/5 Zellen (E2.7.3) wurde nach Denaturierung mit Glyoxal auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (E2.8), auf Nitrozellulose übertragen (E2.9) und mit einer ³²P-markierten HBV DNA Sonde hybridisiert (E2.14).

1.1 Erstellung einer cDNA Bank

Um HBV spezifische mRNAs der PLC/PRF/5 Zelllinie zu klonieren, wurde eine cDNA Bank ausgehend von Poly A⁺ RNA dieser Zelllinie hergestellt. Diese cDNA Bank sollte sowohl eine effiziente Plaquehybridisierung mit einer HBV spezifischen, radioaktiv markierten DNA Sonde als auch - im zweiten Teil dieser Arbeit - eine Identifizierung von cDNA Klonen durch Behandlung eines Immunoblots der ausplattierten cDNA mit tumorspezifischen Antikörpern ermöglichen.

1.1.1 Wahl des Vektors

Um die genannten Kriterien zu erfüllen, mußte der verwendete Vektor ein induzierbares System für die Expression der klonierten Sequenzen enthalten. Die Expression ist für die Durchführung eines Immunoblots notwendig, jedoch unerwünscht, wenn die cDNA Bank mit einer radioaktiv markierten DNA Sonde hybridisiert werden oder amplifiziert werden soll, da durch die Expression für E. coli toxische Sequenzen verloren gehen können.

Diesen Anforderungen entspricht der Phage Lambda gt11 (Young, 1983). Er enthält das Lac Z Fragment der beta-Galaktosidase mit einer EcoRI Schnittstelle für die Klonierung. Klonierte Fragmente können als Fusionsproteine mit dem 5' terminalen Teil der beta-Galaktosidase exprimiert werden. Eine Expression erfolgt jedoch nur nach Induktion mit IPTG bei einer permissiven Temperatur von 37 °C (E2.18.2). Die Expression der beta-Galaktosidase kann außerdem dazu ausgenutzt werden, rekombinante von nicht rekombinanten Phagen zu unterscheiden. Phagen ohne Fremdinsertion exprimieren das Lac Z Fragment der beta-Galaktosidase als funktionsfähiges Enzym und färben sich bei Anwesenheit von IPTG und Xgal blau, während in rekombinanten Phagen der Leserahmen unterbrochen und das Protein daher nicht funktionsfähig ist. Solche Phagen bleiben weiß. Durch DNA Präparation einer Anzahl "weißer" Phagen kann dann die durchschnittliche Größe der klonierten cDNA Fragmente bestimmt werden.

1.1.2 Strategie der cDNA Synthese und Erstellung der cDNA Bank

Die Abfolge der einzelnen Schritte der cDNA-Synthese ist in Abb.5 dargestellt. Im Folgenden sind die kritischen Schritte beschrieben, die zunächst standardisiert und optimiert wurden.

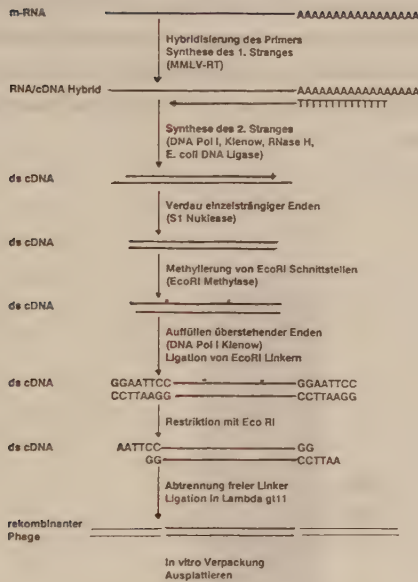


Abb. 5 Strategie der cDNA Synthese zur Erstellung einer cDNA Bank der PLC/PRF/5 Zelllinie

Die einzelnen Syntheseschritte sind aufgeführt. Nach der Synthese des 1. Stranges, nach dem Verdau mit S1-Nuklease sowie nach der Restriktion der Linker wurde die cDNA über SG50 größenfraktioniert. Die endgültige Abtrennung der Linker erfolgte im Anschluß an die SG50 Säule über eine Biogel A50 Säule. Details der einzelnen Schritte sind im Methodenteil (2.17) beschrieben.

Ein wichtiges Kriterium für die Qualität der cDNA Bank ist die Intaktheit der eingesetzten mRNA, da eine degradierte mRNA nur ineffizient revers transkribiert werden kann und die generierten cDNA Fragmente zu kurz sind. Um sicherzustellen, daß während der einzelnen Isolierungsschritte keine Degradationen der mRNA aufgetreten waren, wurde die zunächst aus der PLC/PRF/5 Zelllinie isolierte Gesamt-RNA (E2.7.1) auf einem nativen Agarosegel aufgetrennt (E2.8). Eine intakte RNA zeigt zwei scharfe Banden der ribosomalen 28 S und 18 S RNA (Abb. 6). War keine Degradation in der Gesamt-RNA nachzuweisen, wurde die mRNA durch dreimalige Chromatographie über eine Oligo dT Zellulose Säule isoliert (E2.7.3). Durch Auftrennung des Durchlaufs der Oligo dT Zellulose Säule, welcher die ribosomale RNA enthält, auf einem nativen Agarosegel wurde indirekt

die Intaktheit der später eluierten mRNA überprüft. Schließlich wurde auch die isolierte mRNA auf einem Agarosegel aufgetrennt, um nachzuweisen, daß die rRNA vollständig abgetrennt war. Daß die eingesetzte wie die eluierte RNA intakt war und daß keine ribosomalen Kontaminationen in der isolierten Poly A⁺ RNA nachzuweisen waren, ist aus Abb. 6 ersichtlich. rRNA stört bei Erstellung einer cDNA Bank, da sie durch Ausbildung von Sekundärstrukturen, die Startstellen für eine reverse Transkription bilden, sehr effizient in cDNA überschrieben würde und ribosomale cDNAs in der cDNA Bank unerwünscht waren.

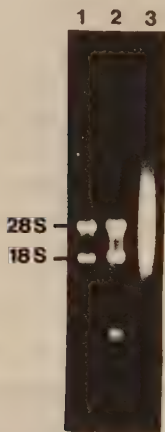


Abb. 6 Überprüfung der Intaktheit der für die cDNA Synthese verwendeten mRNA.

Jeweils 1 µg RNA wurden auf einem nativen, 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (E2.8). Spur 1: Gesamt-RNA der PLC/PRF/5 Zelllinie. Spur 2: ribosomale RNA nach Chromatographie über Oligo dT Zellulose. Spur 3: PolyA⁺-RNA, Eluat der Oligo dT Zellulose Säule (E2.7.3).

Für die Synthese des ersten Stranges der cDNA kann die Reverse Transkriptase des Avian Myeloblastosis Virus (AMV-RT) oder die Reverse Transkriptase aus Moloney Leukemie Virus (MMLV-RT) verwendet werden. Um zu untersuchen, welches der beiden Enzyme besser für die Synthese der cDNA geeignet ist, wurde mit beiden Enzymen eine radioaktive cDNA ausgehend von 0,5 µg zellulärer Poly A⁺ RNA hergestellt und auf einem alkalischen Agarosegel aufgetrennt. Mit AMV-RT lag die Größe der synthetisierten cDNA zwischen 0,2 und 2,5 kb, wobei kleinere Fragmente verhältnismäßig stark vertreten waren. Mit MMLV-RT war die cDNA zwischen 0,2 und 3,5 kb groß bei einer gleichmäßigeren Verteilung der Größen und bedeutend weniger an sehr kleinen

Fragmenten zwischen 0,2 und 0,3 kb (Abb. 7). Da eine cDNA größerer durchschnittlicher Länge mehr Transkripte voller Länge enthält, wurde für die Klonierung die MMLV-RT verwendet.

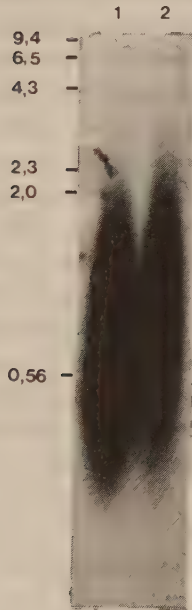


Abb. 7 Größenvergleich der mit AMV-RT bzw. MMLV-RT synthetisierten, ^{32}P -markierten cDNA.

Jeweils 0,5 μg mRNA der PLC/PRF/5 Zelllinie wurden mit AMV-RT (Spur 1) oder MMLV-RT (Spur 2) revers transkribiert (E2.17.1) und dabei mit 1 μCi ^{32}P -dCTP markiert. Das DNA/RNA Hybrid wurde anschließend auf einem 1 %igen alkalischen Agarosegel aufgetrennt (E2.11.2) und über Nacht autoradiographiert. Als Größenmarker sind die Fragmentlängen HindIII verdauter Lambda DNA angegeben.

Für die Herstellung der cDNA Bank wurden 3 μg mRNA aus der PLC/PRF/5 Zelllinie in cDNA überschrieben. Auch hierbei wurde der erste Strang der cDNA mit ^{32}P markiert, um cDNA haltige Fraktionen nach den einzelnen säulenchromatographischen Größenfraktionierungen identifizieren zu können. Gleichzeitig ermöglicht die Markierung die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

(cpm/ μ g) und dadurch die Berechnung der Ausbeute an cDNA nach den einzelnen Schritten (Tabelle I). Nach der Synthese des zweiten Stranges, eines S1 Nuklease Verdau, durch den Haarnadelstrukturen abgebaut wurden, der Methylierung an Eco RI Schnittstellen, um eine spätere Restriktion innerhalb der cDNA zu vermeiden, Auffüllen überstehender Enden, Ligation von EcoRI-Linkern (E2.17.2 - E2.17.6) und deren Restriktion, bestand nun darin die Aufgabe, freie "Linker" vollständig von der cDNA abzutrennen. Da diese in einem hohen molaren Überschuß gegenüber der cDNA vorliegen, kann auch ein kleiner Rest dazu führen, daß die Mehrzahl der Phagen "Linker", aber keine cDNA enthalten. Für die Abtrennung der niedermolekularen "Linker" von der hochmolekularen cDNA stehen verschiedene Methoden zur Auswahl, die alle auf einer Größenfraktionierung der cDNA beruhen. Da bei einer Gelelektrophorese die Größe der präparierten DNA genau bestimmt werden kann, wurde zunächst versucht, die cDNA über ein präparatives Agarosegel zu reinigen (2.11.1). Der Nachteil bei dieser Methode war jedoch, daß die anschließende Ligation der cDNA in den Vektor ineffizient und die Ausbeute an rekombinanten Phagen entsprechend gering war. Daraufhin wurde die cDNA über eine Biogel A50 Säule größenfraktioniert und die Größe anschließend auf einem Agarosegel überprüft. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Säule mit Linkern überladen war und die cDNA Fraktion nach wie vor Linker enthielt. Erst nach einer Vorfraktionierung der cDNA über eine SG50 Säule, bei der die DNA ein erstes Mal größenfraktioniert und bereits ein großer Teil der "Linker" abgetrennt wurden, konnten mit der Biogel A50 Säule die "Linker" vollständig abgetrennt werden (E2.17.7). Es wurden nur die ersten neun radioaktiven Fraktionen (je 0,5 ml) vereint, um kleinere cDNA Fragmente der späteren Fraktionen und die "Linker" vollständig zu entfernen (Abb. 8).

Tabelle I Ausbeuten an cDNA nach den einzelnen Syntheseschritten

	Ausbeute cDNA	
Synthese des 1. Stranges	1900 ng ss cDNA	63 % der PolyA ⁺ -RNA
Synthese des 2. Stranges	3500 ng ds cDNA	84 % des 1. Stranges
S1 Nuklease Verdau	2700 ng ds cDNA	77 % der ds-cDNA
Größenfraktionierung (Abtrennung von cDNA Fragmenten < 0,5 kb)	1300 ng ds cDNA	
Methylierung	1200 ng ds cDNA	
Ligation, Restriktion und Abtrennung der Linker	340 ng ds cDNA	

In Tabelle I sind die Ausbeuten an cDNA nach den einzelnen Syntheseschritten zusammengefaßt.

Entscheidend für die Qualität der cDNA Bank ist die Ausbeute an erstem und zweitem Strang der cDNA, da sie indirekt Auskunft über die durchschnittliche Länge der cDNA gibt: Bei einer hohen

Ausbeute sind die Transkripte länger als bei einer niedrigen. Die S1 Nuklease Resistenz gibt Auskunft über die Qualität der cDNA, da alle vorhandenen Einzelstrangbereiche abgebaut werden. Eine hohe S1 Nuklease Resistenz deutet also darauf hin, daß ein entsprechender Prozentsatz der cDNA tatsächlich vollständig doppelsträngig ist. Die hier erzielten Ausbeuten zeigen, daß eine ausreichende Länge der doppelsträngigen cDNA Fragmente erreicht wurde.

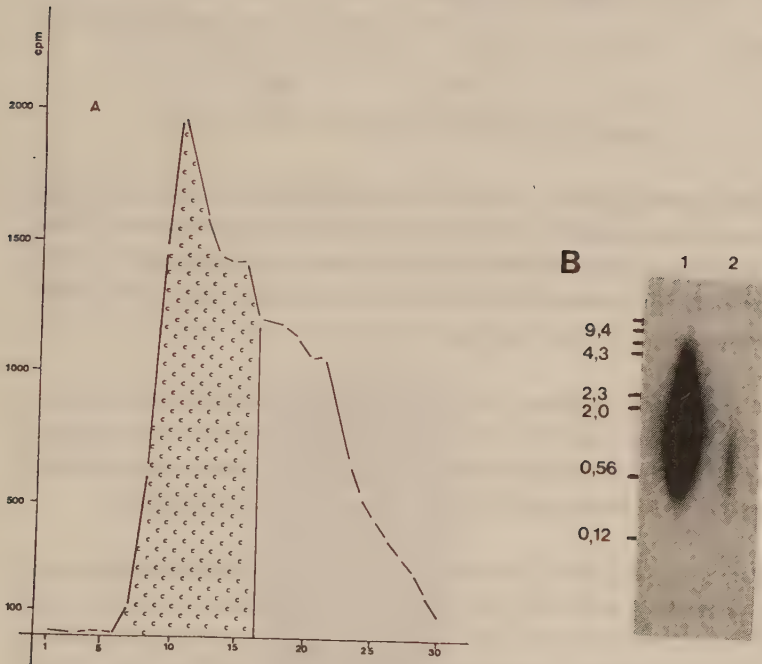


Abb. 8 Kontrolle der Abtrennung der "Linker" von der cDNA

A: Elutionsprofil der cDNA von der Biogel A50 Säule. Die cDNA wurde zunächst über eine SG50 Säule und dann über eine Biogel A50 Säule größenfraktioniert (E2.17.7). Es wurden Fraktionen zu je 300 μ l gesammelt. Die Fraktionen (7 - 16), welche vereint und später in Lambda gt11 ligiert wurden, sind gepunktet wiedergegeben.

B: Größenbestimmung der von der Biogel A50 Säule eluierten cDNA. Je 1/10 der vereinten Fraktionen 7 - 16 sowie 17 - 25 wurde zur Größenabschätzung auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (E2.11) und autoradiographiert. Als Größenmarker sind die Fragmentlängen HindIII verdauter Lambda DNA angegeben.

Da die Anzahl rekombinanter Phagen der cDNA Bank entscheidend vom Verhältnis von cDNA zu Vektor bei der Ligation abhängt, wurde die cDNA in 3 verschiedenen Verhältnissen mit Lambda gt 11 ligiert (Tabelle II) und anschließend in vitro verpackt.

Tabelle II Anzahl rekombinanter Phagen bei verschiedenen Verhältnissen von cDNA zu Lambda gt11			
Vektor-DNA	cDNA	pfu	% rekombinante Phagen
1 ug	50 ng	$9,3 \times 10^5$	88,3
1 ug	100 ng	$1,9 \times 10^5$	67,5
1 ug	190 ng	785	33

In der Tabelle sind die eingesetzten Verhältnisse der zu ligierenden cDNA zum Vektor Lambda gt11 und die jeweils erzielten Ausbeuten an rekombinanten Phagen in pfu ("plaque forming units") wiedergegeben. Das beste Ergebnis wurde mit einem Verhältnis von 50 ng cDNA auf 1 ug Vektor erreicht. Geht man von einer durchschnittlichen Länge der cDNA von 800 bp aus, so ist das molare Verhältnis von cDNA zu Vektor bei dieser Ligation etwa 2 : 1.

Aufgrund der radioaktiven Markierung der cDNA können Verluste durch Radiolyse auftreten. Die cDNA Bank wurde daher auf *E. coli* Y1090 bei 42 °C amplifiziert. Bei dieser nicht permissiven Temperatur und ohne IPTG Induktion unterbleibt eine Expression der klonierten Sequenzen, so daß auch Sequenzen, die für toxische Produkte für *E. coli* kodieren, amplifiziert werden können.

Um zu überprüfen, ob die rekombinanten Phagen der cDNA Bank cDNA Fragmente enthalten oder ob auch "Linker" kloniert worden sind, wurden 10 Phagen der cDNA Bank isoliert und auf die Größe ihrer Insertionen hin untersucht. Die DNA dieser 10 Phagenisolate wurde in kleinem Maßstab präpariert (E2.10.8), mit EcoRI restringiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (E2.11). 6 der 10 Phagen-DNAs enthielten cDNA Insertionen von etwa 600 bis 1500 bp. Die restlichen 4 Phagen-DNAs enthielten entweder gar keine oder sehr kleine cDNA Fragmente. Man kann also davon ausgehen, daß etwa 60 % der rekombinanten Phagen und damit 55 % aller Phagen der cDNA Bank cDNAs Insertionen signifikanter Länge tragen.

1.2 Isolierung HBV positiver cDNA Klone

1.2.1 Identifizierung HBV Sequenzen enthaltender cDNAs

Um HBV Sequenzen enthaltende cDNAs zu identifizieren, wurden 1×10^5 Phagen auf einer 20×20 cm großen Agarplatte ausplattiert und bei 42°C über Nacht inkubiert. Nach Übertragen der Phagen-DNA auf zwei Nitrozellulosefilter (E2.18.1) wurden diese mit einer ^{32}P -markierten HBV-DNA Sonde hybridisiert (E2.18.1). Dabei konnten 6 positive Plaques identifiziert und durch dreimaliges Ausplattieren und Hybridisieren gereinigt werden.

1.2.2 Reklonierung der HBV Sequenzen enthaltenden cDNAs

Von den 6 gereinigten Phagen (pcAL-36 - pcAL-41) wurden zunächst Plattenlysate hergestellt (E2.17.11) und daraus die DNA in kleinem Maßstab präpariert (E2.10.8). Nach Restriktion der DNA mit EcoRI wurde die Größe der klonierten cDNAs durch gelelektrophoretische Auftrennung bestimmt (Abb.9). pcAL-36 enthält die größte cDNA mit eine Länge von ca. 2 kb, während pcAL-38 nur ca. 300 bp groß ist und die übrigen vier cDNAs ca. 400 bp groß sind.

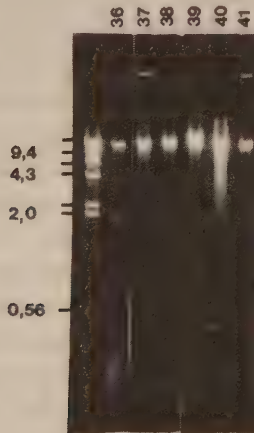


Abb. 9 Größenbestimmung der cDNAs der Klone pcAL-36 - pcAL-41.

Die Phagen DNA wurde in kleinem Maßstab präpariert (E2.10.8). 1 μg wurden mit EcoRI verdaut und auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (E2.11). Die cDNA in pcAL-36 ist ca. 2 kb lang, in pcAL-38 etwa 300 bp und in den restlichen 4 Klonen etwa 400 bp lang. Als Größenmarker sind die Fragmentlängen HindIII verdauter Lambda DNA angegeben.

Da das Arbeiten mit Phagen DNA sehr aufwendig ist und die Ausbeuten an cDNA Fragmenten bei präparativer Aufarbeitung der Phagen DNA sehr gering sind, wurden die drei cDNAs pcAL-36, pcAL-40 und pcAL-41 in den Plasmidvektor pUC19 rekloniert, während die anderen cDNAs nicht weiter untersucht wurden. Um die rekombinante Lambda gt11 DNA in der dazu notwendigen Menge zu isolieren, wurden zunächst lysogene Bakterien (*E. coli* Y 1089, E2.17.12) mit diesen Phagen hergestellt, um dann durch deren Anzucht und nachfolgende Induktion des lytischen Zyklus ein Flüssiglysat zu erhalten (2.17.12). Aus diesen Flüssiglysaten wurde die DNA isoliert (2.10.7). 2 µg davon wurden mit EcoRI restringiert und nach Zugabe 200 ng EcoRI restringierten und dephosphorylierten pUC19 Vektors ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurden kompetente *E. coli* JM109 transformiert (E2.15). Klone mit cDNA Insertionen wurden durch Präparation der DNA in kleinem Maßstab (E2.10.4) und Restriktionsverdau identifiziert. Alle drei Klone konnten auf diese Weise rekloniert werden.

1.3 Charakterisierung der cDNAs

1.3.1 Charakterisierung von pcAL-40 und pcAL-41

Die cDNA Fragmente lagen nun im pUC19 Vektor vor, der ein direktes Sequenzieren nach der Dideoxystrangabbruchmethode ermöglicht (Chen, 1985). Im Gegensatz zu pcAL-36 war bei den kurzen cDNAs in pcAL-40 und pcAL-41 eine Restriktionskartierung nicht notwendig. Beide Klone wurden in voller Länge sequenziert (E2.16). Dabei stellte sich heraus, daß sowohl pcAL-40 als auch pcAL-41 zu der Sequenz von Position 14 bis 410 des HBV Genoms zu 96,2 % homolog sind, sie also exakt die gleichen Sequenzen aus dem HBs-Gen enthalten und damit denselben Klon der nicht amplifizierten cDNA Bank darstellen. Vermutlich sind solche kurzen Sequenzen in der amplifizierten cDNA Bank häufiger vertreten, während längere HBV haltige cDNAs unterrepräsentiert sind. Die identische Sequenz der beiden cDNA Klone ist in Abb. 10 wiedergegeben, ebenso die Zuordnung zu der entsprechenden Sequenz im HBV Genom. Das AUG Startkodon für eine Translation des HBsAg (Position 157 des HBV Genoms) ist auf diesen cDNA Klonen vorhanden, so daß eine HBsAg Synthese von den entsprechenden mRNAs möglich ist. Eine genauere Aussage über die Funktion dieser Sequenzen in der Zelle ist nicht möglich, da die cDNA nur etwa 20 % der Länge der mRNA von 2,0 oder 2,6 kb abdeckt und auch keine flankierenden zellulären Sequenzen in diesen Klonen enthalten sind.

```

1  TCCACCAAGCTCTGCAAGATCCCAGAGTCAGGGGCCTGTATTTTCCTGCT 50
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
14 TGCACCAAGCTCTGCAGGATCCCAGAGTCAGGGGCTGTATCTTCCTGCT 63
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
51 GGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGCTCAGAAATATTGCCTCTCA 100
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
64 GGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGCTCCGAATATTGCCTCTCA 113
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
101 CATCTCGTCAATCTCCTCGAGGACTGGGGACCCTGCACCGAATATGGAGA 150
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
114 CATCTCGTCAATCTCCGCGAGGACTGGGGACCCTGTGACGATCATGGAGA 163
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
      PreS2 ← 5'-Gen
151 ACATTACATCAGGATTCTTAGGACCCTGCTCGTGTACAGCGGGGTTT 200
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
164 ACATCACATCAGGATTCTTAGGACCCTGCTCGTGTACAGCGGGGTTT 213
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
201 TTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTG 249
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
214 TTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTG 263
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
250 GACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGATCACCCTGTGTCTTGGCCAAAATT 299
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
264 GACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGATCACCCTGTGTCTTGGCCAAAATT 313
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
300 CGAAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCCTGTCTCCAATTGT 349
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
314 CGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCCTGTCTCCAATTGT 363
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
350 CCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTATCATATTCCTCTT 396
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
364 CCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTATCATATTCCTCTT 410
  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

```

Abb. 10 Sequenzvergleich von pcAL-40 und pcAL-41 mit dem HBV Genom

Die Sequenz der cDNA Klone pcAL-40 und pcAL-41 ist im Vergleich zur HBV Sequenz angegeben. Es besteht eine 96,2 %ige Homologie der cDNA Klone mit den Nukleotiden 14 - 410 des HBs-Gens. Eingezeichnet ist das AUG Startkodon für die Translation des HBsAg.

1.3.2 Charakterisierung von pcAL-36

Da die mit HBV hybridisierenden mRNAs in der PLC/PRF/5 Zelle 2 bzw. 2,6 kb groß sind (Ou, 1985, Abb. 4), war anzunehmen, daß pcAL-36 den größten Teil einer solchen mRNA wiedergibt. Die mRNA, die den cDNA Klon pcAL-36 generierte, soll im folgenden AL-36 mRNA genannt werden.

1.3.2.1 Restriktionskartierung von pcAL-36

Da die Größe von pcAL-36 ein Durchsequenzieren nicht ermöglicht, wurde zunächst eine Restriktionskartierung durchgeführt, um geeignete Fragmente für die Sequenzierung klonieren zu können. Ein Vergleich der Restriktionskarten der cDNA und des HBV Genoms ermöglicht eine erste Zuordnung der cDNA zu bestimmten HBV Genen. Für Testverdaus wurden folgende Enzyme verwendet, da sie in HBV Sequenzen ein- bis viermal schneiden: Aval, AvasI, HgaI, BamHI, NcoI, PvuII, SphI, SstI, SalI, TaqI, XmnI. In Tabelle III sind die Enzyme, die pcAL-36 schneiden, zusammengefaßt; die übrigen Enzyme schneiden nicht.

Tabelle III Restriktionsschnittstellen in pcAL-36

Enzym	Anzahl der Schnittstellen
AccI	3 - 4
BamHI	1
NcoI	1
SphI	1
AvaII	2
HgaI	2

Um die Reihenfolge der Schnittstellen in pcAL-36 festzulegen, wurde das gereinigte cDNA Insert zunächst mit einem bzw. mit zwei Enzymen verdaut, welche ein- oder zweimal in der Sequenz schneiden, und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Enzymmengen wurden so gewählt, daß die DNA nur partiell verdaut wurde. Aus den nicht vollständig verdauten Banden läßt sich die Nachbarschaft zweier Fragmente ableiten. Um Fragmente mit viralen Sequenzen zu identifizieren, wurde die DNA auf Nitrozellulose geblottet und mit einer ³²P-markierten HBV Sonde hybridisiert (E2.14). Abb. 11 zeigt das Agarosegel der Restriktionskartierung und das Autoradiogramm nach Hybridisierung mit der HBV Sonde. In Abb. 12 sind die ermittelten Fragmentlängen und deren Anordnung und die daraus ermittelte Restriktionskarte von pcAL-36 im Vergleich zur Restriktionskarte des HBV Genoms wiedergegeben.

Nachdem die Schnittstellen für ein- und zweimal schneidende Enzyme festgelegt waren, wurden auch die Schnittstellen für *AccI* kartiert. Das Ergebnis ist ebenfalls in Abb. 11 und Abb. 12 dargestellt.

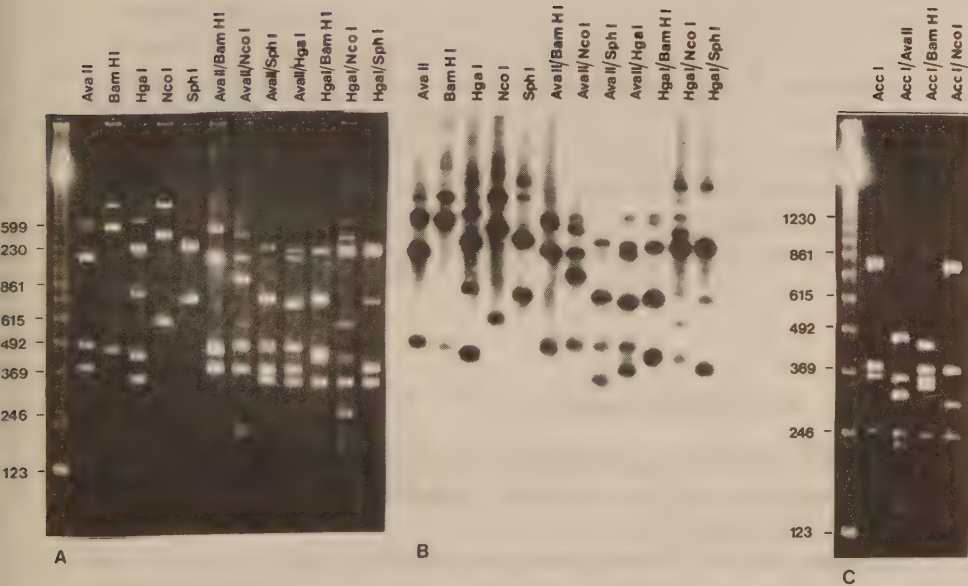


Abb. 11 Restriktionskartierung von pcAL-36.

A und B: Dargestellt sind das 1,5 %ige Agarosegel (A) und das Autoradiogramm (B) zur Kartierung von Enzymen mit einer oder zwei Schnittstellen. 0,5 µg des pcAL-36 "Inserts" wurde mit den angegebenen Enzymen partiell restringiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde auf Nitrozellulose geblottet und mit einer ^{32}P -markierten HBV Sonde hybridisiert (E2.14). Aus dem Vergleich der Bandenmuster des Gels und des Autoradiogramms läßt sich die Lokalisation viraler Sequenzen in pcAL-36 ableiten. Als Größenmarker wurde eine 123 bp Leiter verwendet.

C: Kartierung der *AccI* Schnittstellen. Dargestellt ist das 1,5 %ige Agarosegel. Die DNA wurde wie in A beschrieben restringiert und aufgetrennt. Da die Lokalisation von HBV Sequenzen bereits bekannt war, wurde kein Southern Blot durchgeführt.

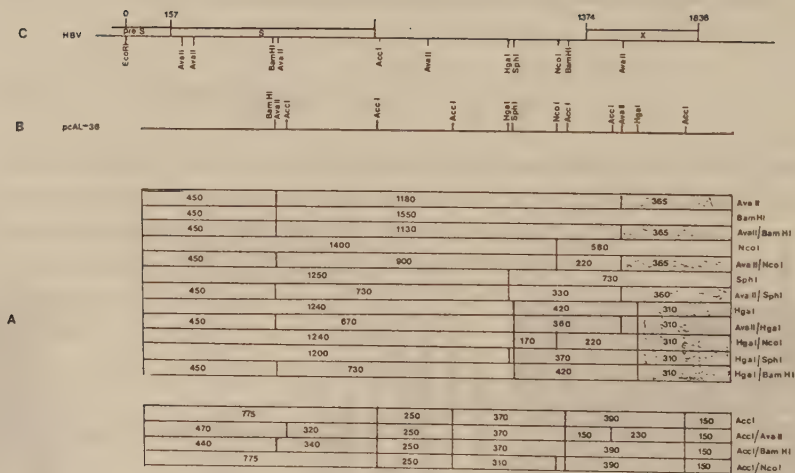


Abb. 12 Restriktionskartierung von pcAL-36

A: Dargestellt sind die aus den Agarosegelen und aus dem Autoradiogramm abgeleiteten Fragmentlängen nach Restriktion mit den angegebenen Enzymen und die aus den Partial- und Doppelrestriktionen ermittelte Anordnung der Fragmente. Nicht mit HBV hybridisierende Fragmente sind grau unterlegt.

B: Restriktionskarte von pcAL-36.

C: Restriktionskarte des HBV Genoms im Bereich des S- und X-Genes

Die Restriktionskartierung ergab, daß ca. 1550 bp am 5' Ende von pcAL-36 kolinear mit dem HBV Genom sind und daß sich am 3' Ende ein nicht mit HBV hybridisierender Bereich zellulärer Sequenzen von etwa 360 bp befindet. Dies war insofern kein unerwarteter Befund, als daß Hybrid-mRNAs aus der PLC/PRF/5 Zelllinie bereits früher beschrieben worden sind (Ou, 1985; Freytag von Loringhoven, 1985). Das kürzeste, am 5' Ende erhaltene Fragment ist etwa 450 bp lang und hybridisiert mit der HBV DNA. Das Hybridisierungssignal ist jedoch schwächer als bei den meisten anderen Banden. Auch konnten in diesem Fragment zwei AvaII Schnittstellen, die sich an der

entsprechenden Stelle im HBV Genom befinden, nicht identifiziert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß sich auch am 5' Ende dieses Klonen ein Bereich nicht viraler Sequenzen befindet.

1.3.2.2 **pcAL-36 als Sonde für einen genomischen Southern Blot**

Parallel zur Restriktionskartierung wurde mit der gesamten Sequenz von pcAL-36 als Sonde ein Southern Blot HindIII verdauter genomischer DNA verschiedener Zelllinien durchgeführt (E2.12 - E2.14). Zum Vergleich wurde auch eine Hybridisierung mit einer HBV Sonde (gesamtes Genom) durchgeführt. Wie erwartet, wurde mit pcAL-36 das HBV spezifische Bandenmuster erhalten (PLC/PRF/5: 32,0; 25,0; 18,0; 10,0; 6,0; 4,0; 1,9 kb und huH1: 11,8; 7,6; 6,2; 2,5 kb, Abb. 13). Zusätzlich zu HBV spezifischen Banden trat nach der Hybridisierung mit pcAL-36 eine sehr starke Bande von etwa 5,5 kb auf, die ihrer Intensität nach keine genomische Sequenz mit einer singulären Kopie darstellen konnte. Neben der Möglichkeit, daß es sich bei dieser Sequenz um eine repetitive Sequenz handeln kann, könnte das Ergebnis auch auf einem experimentellen Artefakt beruhen. Es konnte durch Wiederholung des Southern Blots jedoch gezeigt werden, daß es sich nicht um eine Kontamination z.B. eines Puffers mit einer Fremdsequenz handelt. Wie sich nach der Sequenzierung von pcAL-36 herausstellte, wurde diese Bande durch Hybridisierung der 5' zellulären Sequenzen in pcAL-36 hervorgerufen (1.3.2.3.4).

1.3.2.3 **Sequenzanalyse von pcAL-36**

Anhand der Restriktionskarte wurde pcAL-36 in 8 Fragmente in pUC19 subkloniert (Abb. 14). Mit Hilfe dieser Subklone konnte die gesamte Sequenz nach der Dideoxystrangabbruchmethode bestimmt werden (E2.16). Wie aus Abb. 14 ersichtlich wird, konnte ein großer Teil der Sequenz durch Sequenzierung ausgehend vom 3' bzw. vom 5' Ende der Subklone und durch überlappende Klone doppelt oder dreifach bestätigt werden, so daß Sequenzierfehler weitgehend ausgeschlossen werden können. Abb. 15 gibt die gesamte Sequenz von pcAL-36 wieder.

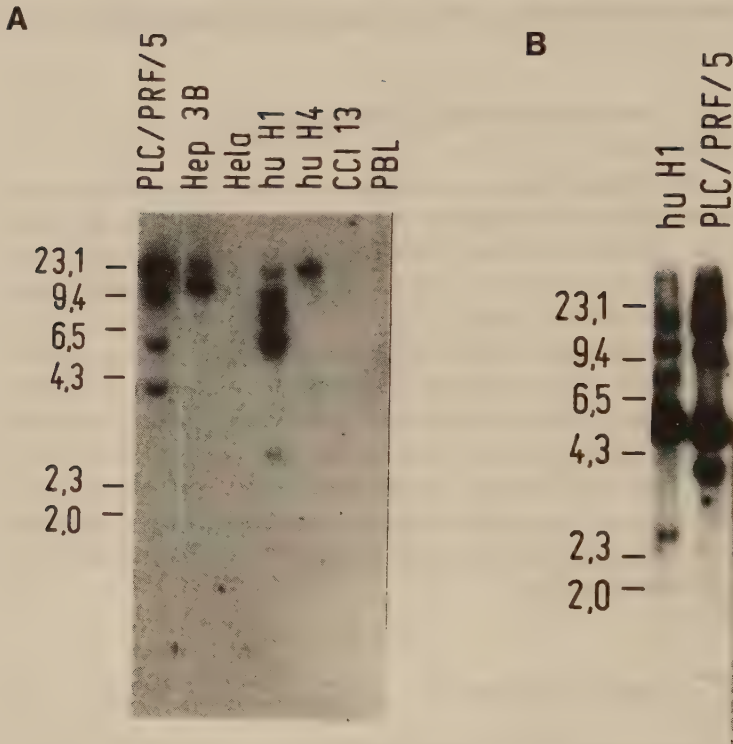


Abb. 13 Southern Blot Analyse genomischer humaner DNA.

Jeweils 10 µg DNA aus PLC/PRF/5, huH1, Hep3B, Hela, huH4, CCL13 Zellen und peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurde mit HindIII verdaut, auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (E2.11), auf Nitrozellulose übertragen (E2.12) und mit einer 32 P-markierten HBV Sonde (A) oder pcAL-36 (B) hybridisiert (E2.14). Als Größenmarker wurde HindIII verdaute Lambda DNA verwendet.

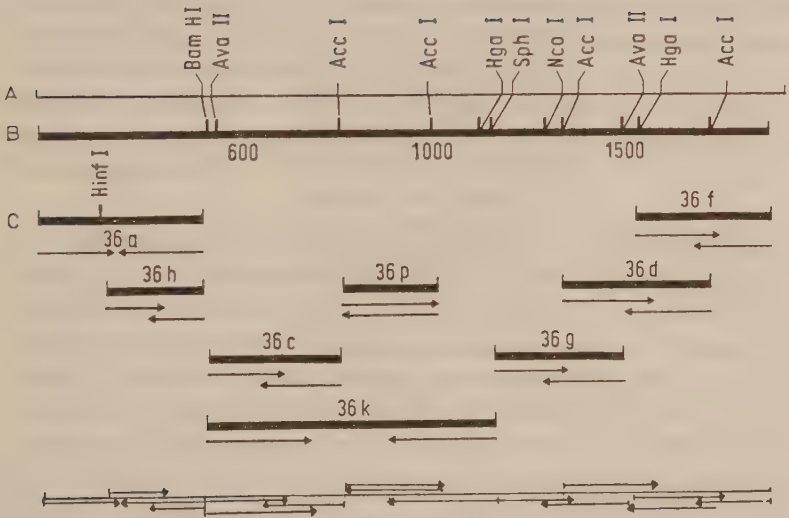


Abb. 14 Subklonierung von pcAL-36 zum Sequenzieren

Dargestellt sind die 8 zur Sequenzierung hergestellten Subklone (C). Die Pfeile geben die sequenzierten Bereiche an, die in D zusammengefaßt sind. A stellt die durch Restriktionskartierung ermittelte Restriktionskarte von pcAL-36 dar, B gibt die nach der Sequenz korrigierte Karte wieder.

```

1  GGGTGGTTC GAAGAAGNN TGTAAATAT GATTACGTC TGTGGCTGT
51  AATGCTTATA ATTAGGAGA TTGTAGBGA GATTAGTATA GAGAGGTAGA
101 GTTCTTCCTG TGTATGTGT TCATCGGATA AGTGGCTGTG GCTTGGCAIG
151 CATGTGACG GGTAGGAGT CAGGTABTA GTATTAGGAG GGGGGTGGG
201 TAGGGTCAG AGGAAGAAT TCGGGCCAG CTAAATAGT TATTCGCCAA

      exon/exon junction
251 CTTTCTCTCG ACCCTYARG CCCCACCTC CAACTACCA CCAACCTCCT
301 GTCTCCAAAT TTGCTCTGCT YATCGCTGA TATGCTGGC CGGTTTATC
351 ATATCTCTCT TCATCTGCTT GCTATGCTC ATCTCTTAT TGGTTCTCTT

      BamHI
401 GGACTATCAA GGTATGTTGC CCGTTGTGTC TCTAATTCTC AGGATCCACA

      AvalI
451 ACACACAGTA CGGACCCCTG CAACACCTC ACGACTCTG CTCAGGGCAA
501 CTCTATGTTT CCTCATGTT GCTGTACAA ACCTCCGGAT GGAAATTGCA
551 CCTGTATTCG CATCCCATCA CTGGGGCTTT CGCAAAATAC CTATGGGAGT
601 GGGGGCTCAG CCGTTCTCTT TGGCTCAGTT TACTAGTGC ATTTGTTGAG
651 TGGTCTGAG GGTCTTCCCC CACTGTGGT CTTCAGTTA TATGGATGAT
701 GTGTATTGG GGGCAATC TGACACATC CTTGAGTCC TTATACEGG

      AccI
751 TGTACCAAT TTCTTTTGT CTTTGGGAT ACATTAAAC CTAACAAAA
801 CGAAGAGATG GGGTATTEC CTAAACTCA TGGGATATGT AATTGGAGT
851 TGGGGTACTT TGCCACAGGA CATATATGA CAAAAATCA AATGCTGTT
901 TAGGAACCTT CCGTCAATC CTACCTATG ATTGAAAGT ATGTCAAGA
951 AITGTGGTC TTTGGGCTT TGGCGGCCC TTYACAAAT GTGGTTACCC

      AccI
1001 TGCCCTAATG CCTTTATATG CATGTATACA AGCAAAACG GCTTTACTT
1051 TCTGCCAAG TTACAGGCC TTCTTAAGA AATGATATAT GAACCTTAC

      HpaI
1101 CTTTCCGCG AACGCTGCG TGTCAAGGT TGTCTTGAG CAACTCCAC

      SmaI
1151 TGGCTGGGG TTGGCTATGG GGCATCAGG CATCGCTGA GCTTTTGG
1201 CTCTCTGCG CATCCACTT GCGGAATTE TTGAGAGTG TTTTGTGCG
1251 AGCGGTCTG GAGCGAAGT CATCGGACT GATAATCTG TGTCTCTTT

      MclI
1301 TCGAAATAT ACATATTTC CATGGCTGCT AGGTTGCTG GCTACTGGA

      AccI
1351 TTCTTGGGG GAGTCTCTT GCTAGCTG GCTGGGCTT GAATCTGGG
1401 GAGGACCTC CCGGGGCGG TTGGACTTA TGTGCCCCT CTTGCTGCG
1451 GGTACCTCC GACCAAGGG GCACTCTCT TTAACGGGT TTCCCCGCT

      AvalI
1501 GTTCTACTC ATCTGCGGT CCGGTACAC TTTGCTTAC CTGTGCAGG

      HpaI
1551 CCGATGGAAA AGGCACTCG CATGAACAT TACTAAGTG GTCCTTGA

1601 CTGTATTAAT GTAGCAATAA TTATACATT GTGTAAATG GGTATGTAA

      exon/exon junction
1651 CAATCAATA ATTATGGTT TGGTATACCA CAAAAAAGG AAACCTCAGT
1701 TACGAGAGT TGTGAATGA AAGCAACAT GAGCGAGTA CTTTCTACT

      AccI
1751 TAGACAGGAC GTAGCAACG CTCAGAGGT TGAAGCTC AGCGTGTGA
1801 ACATGTGTT GAAATGGAT CCTCCGCTT TGGTCTGGG ACTAAAGCT
1851 GCTATACAA CTTTCAAGT ATATTGGAG CCACTAGCC GAACT

```

Abb. 15 Sequenz von pcAL-36

In die Sequenz eingezeichnet sind die Restriktionsschnittstellen, die Exon/Exon-Übergänge und die ermittelten Homologiebereiche zum mitochondrialen Leserahmen URF4 (kursiv, vergl. Abb. 18), HBV (vergl. Abb. 17) und den zellulär flankierenden Sequenzen in AL10.5 und AL10.7 (unterstrichen, vergl. Abb. 16) sowie die neu identifizierten zellulären Sequenzen (kleine Buchstaben).

1.3.2.3.1 Besonderheiten der Sequenz von pcAL-36

Die Sequenz von pcAL-36 wurde mit Hilfe der Computerprogramme für eine Sequenzanalyse (UWGGC und PIR) mit der Sequenzdatenbank "Genbank" (Devereux, 1984) verglichen. Die Sequenzabgleiche ergaben, daß sich pcAL-36 in 3 Hauptabschnitte unterteilen läßt: Flankierende zelluläre Sequenzen am 3' Ende, virale Sequenzen und flankierende zelluläre Sequenzen am 5' Ende. Die zellulären Sequenzen lassen sich aufgrund ihrer Homologien zu bekannten Sequenzen weiter unterteilen (1.3.2.3.2).

1.3.2.3.2 Flankierende zelluläre Sequenzen am 3' Ende von pcAL-36

Die 3' flankierenden, zellulären Sequenzen erstrecken sich über 357 bp. Die letzten 233 bp am 3' Ende von pcAL-36 (Position 1676 - 1899) zeigen keine Homologien zu bisher bekannten Sequenzen, im Gegensatz zu den unmittelbar 3' der viralen Sequenzen gelegenen 124 bp (Position 1551 - 1675), welche eine Homologie von 95,3 % zu den flankierenden Sequenzen der genomischen, integrierte HBV Sequenzen enthaltenden Klone aus der PLC/PRF/5 Zelllinie AL10.5 und AL10.7 (Koch, 1984) aufweisen (Abb. 16). Auch die Position des viral/zellulären Überganges in pcAL-36 entspricht dem der genomischen Klone. Diese Daten lassen vermuten, daß die AL-36 mRNA ein Transkript eines dieser beiden Integrate ist.

Die Klone AL10.5 und AL10.7 entsprechen zwei HBV Integraten der PLC/PRF/5 Zelllinie. Sie beginnen an einer ungewöhnlichen HindIII Schnittstelle in HBV Sequenzen. Eine HindIII Schnittstelle kommt normalerweise im HBV Genom nicht vor, so daß bei der Klonierung der Integrate der PLC/PRF/5 Zelllinie mit HindIII davon ausgegangen worden war, daß sowohl die 3' als auch die 5' flankierenden zellulären Sequenzen kloniert würden (Koch, 1984). Da durch eine Punktmutation in den integrierten HBV Sequenzen offensichtlich eine HindIII Schnittstelle entstanden war, enthalten die Klone nur am 3' Ende nicht virale Sequenzen. Diese sind in den beiden Klonen AL10.5 und AL10.7 über 187 bp identisch. Deshalb wird angenommen, daß die beiden Integrate durch Duplikation und Rearrangements auseinander hervorgegangen sind. Falls die AL-36 mRNA ein Transkript von AL10.5 oder AL10.7 ist, muß die flankierende Sequenz nach 124 bp durch Spleißen unterbrochen worden sein. An dieser Stelle (Position 1673) befindet sich in pcAL-36 das Basentriplett AGG, welches häufig den Übergang eines Exons in das nächste kennzeichnet (Crick, 1979). In AL10.5 und AL10.7 befindet sich an der entsprechenden Stelle (Position 121) die Sequenz 5' AGGTAACA 3', welche in den ersten 6 bp identisch mit der "splice donor" Sequenz 5' AGGTAAGT 3' ist (Crick, 1979; Abb. 16). Ein Spleißen an dieser Stelle der mRNA ist wahrscheinlich und steht auch in Übereinstimmung mit den Daten aus den Southern Blot

Hybridisierungen (1.3.2.4; Abb. 20). Somit ist es wahrscheinlich, daß es sich bei der AL-36 mRNA um ein Transkript eines dieser Integrate handelt.

```

      viral<>zellulär
1552 CGCATGGAAAAGGCACCTGCCATGAACACTTACATAAGTGGTCTCTTGN 1600
      |||
      1 CGCATGGAACGGCACCCGCATGAACACTTACATAAGTGAACCCTTGAA 50
1602 CTGTATTAATGTAGCAATAATTATGACATTGTGTAATGTCGGTTATGTAA 1650
      |||
      51 CTGTATTAATGTAGCAATAATTATGACATTGTGTAATGTCGGTTATGTAA 100
      |||
      1652 CAAATCAATAATTAATGGTTTAGGTAACAACAAAAAAAAAAAACTCAGT 1679
      |||
      101 C.AATCAATAATTAATGGTTTAGGTAACAGATTAATGTTATGCCAAGGTT 128
      |||
      AGGTAAGT Donor Splice Site Konsensus

```

Abb. 16 Bereich der zellulär flankierenden Sequenzen am 3' Ende von pcAL-36

Die Sequenz von pcAL-36 (obere Sequenzzeile) ist mit der zellulär flankierenden Sequenz in dem genomischen PLC/PRF/5 Klon AL10.7 (untere Sequenzzeile) vergleichend dargestellt. Die Homologie erstreckt sich über 124 bp (Position 1556 - 1680 von pcAL-36) und beträgt 95,3 %. Bei Position 1673 von pcAL-36 ist das Basentriplett AGG als möglicher Exon/Exon-Übergang markiert. An der homologen Stelle in AL10.7 (Position 121) ist der "Donor Splice Site" Konsensus angegeben.

1.3.2.3.3 Virale Sequenzen

Die HBV spezifischen Sequenzen in pcAL-36 beginnen bei Position 271 des cDNA Klones. Sie erstrecken sich über 1285 bp (bis Position 1552 von pcAL-36) und weisen eine Homologie von 94,9% mit dem HBV Subtyp adw auf (Abb. 17). Diese Sequenz entspricht den Nukleotiden 319 - 1610 des HBV Genoms und beginnt damit im S-Gen, wobei die Nukleotide 157 - 318 des S-Gens fehlen. Ebenso fehlt das 3' Ende des HBx-Genes von den Nukleotiden 1611 - 1824. Rearrangements oder größere Deletionen treten nicht auf, jedoch sind einige Punktmutationen und Deletionen von ein oder zwei Basen vorhanden, die zu Rasterverschiebungen in den Leserahmen führen. Bei einer theoretischen Translation des Leserahmen, welcher HBsAg Spezifität aufweist, würde ein über 44 AS verändertes, N-terminal trunkiertes HBsAg entstehen (1.3.2.6).

>viral
Exon/Exon Übergang
260 GACCCTTAAAGGGCCCAACCTCCCAATCACTCAACCACTCCCTGCTCCCAA 309
310 .AATTGCACTCCCAACCTCCCAATCACTCAACCACTCCCTGCTCCCAA 358
CAAG acceptor splice site consensus
310 TTGTGCTGCTGATATCGTGGATATGTCGGCGGTTTATCATATATTCCTC 359
359 TTGTGCTGCTGATATCGTGGATATGTCGGCGGTTTATCATATATTCCTC 408
360 TTCAATCTGCTGATATGCTCACTTCATATGTTTCTTGGCACTATCA 409
409 TTCAATCTGCTGATATGCTCACTTCATATGTTTCTTGGATATCA 458
410 AGGTATGTTGCGGTTTGTGCTCTATATCTCAGATCCACAAACCACT 459
459 AGGTATGTTGCGGTTTGTGCTCTATATCTCAGATCCACAAACCACT 507
460 ACGGCACTCTGCAAACTCCAGCACTCTGCTCAAGGCAACTCTATGTT 509
508 ACGGCACTCTGCAAACTCCAGCACTCTGCTCAAGGCAACTCTATGTT 557
510 TCCCTCAGTTCGTCGACAAACCTCCGAGTGGAAATTCGACCTGATTC 559
558 TCCCTCAGTTCGTCGACAAACCTCCGAGTGGAAATTCGACCTGATTC 607
560 CCATCCCAATC.ACTTGGGCTTTCGCAAAATCACTTGGGATGGGGCTCA 608
608 CCATCCCAATCCTGGGCTTTCGCAAAATCACTTGGGATGGGGCTCA 657
609 GTGCGTTCTCTGCTGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCACTGTTGCT 658
658 GTGCGTTCTCTGCTGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCACTGTTGCT 707
659 AGGGCTTTCGCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGATGATGTTAT 708
708 AGGGCTTTCGCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGATGATGTTAT 757
709 GGGGCGCAATCTGTCACACACTGATGTCCTTATACCGCTGTACCA 758
758 GGGGCGCAATCTGTCACACACTGATGTCCTTATACCGCTGTACCA 807
759 ATTTCCTGTTCTGTCGTTGATACATTTTAAATCCCTTAACCAACGACAGA 808
808 ATTTCCTGTTCTGTCGTTGATACATTTTAAATCCCTTAACCAACGACAGA 857
Endes S Genes
809 TGGGGTATATCCCTTAAACTCATGGGATGATGATTTGGAAGTTGGGTAC 858
858 TGGGGTATATCCCTTAAACTCATGGGATGATGATTTGGAAGTTGGGTAC 907
859 CTTCGCAAGGATCATATCTGCAAAAATCAAAATGCTGTTTATGAGAAC 908
908 TTTCGCAAGGATCATATCTGCAAAAATGATCAAACTGTTTATGAGAAC 957
909 TTTCGTCATCTCCTACATCATTTGATGGAAAGTATGTCAAAAGATTTGGG 958
958 TTTCGTCATCTCCTACATCATTTGATGGAAAGTATGTCAAAAGATTTGGG 1006

959 TCTTTGGGCTTTGCGGCGCCCTTTACAAATGGTTACCTTCGCTTAA 1008
1007 TCTTTTGGGCTTTGCTGCTCCATTTACAAATGGATATCTGCTTAA 1056
1009 TGCCTTTATATGATCATATAACAAGCAAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCA 1058
1057 TGCCTTTGATATGATCATATAACAAGCTTAAACAGGCTTCACTTTCTCGCA 1106
1059 ACTTAAAGGCTTTCTAAGTAAATAGTATATGAACCTTTTACCC. TTGC 1106
1107 ACTTAAAGGCTTTCTAAGTAAACAGTACATGAACCTTTACCGCTTGC 1156
1107 .CGGCAAGC..CTGCGCTGT..CAAAGGTTGTTGACGCAACCCACACATG 1153
1157 TCGCAACGCGCTGCTGTGCCAAGTGTGCTGACGCAACCCACATG 1206
1154 GCTGGGGCTTGGCTATGGGCAATCAGCGCATGCTGGAGCCTTTTGGCT 1203
1207 GCTGGGGCTTAGCCATAGGCGCATCAGCGCATGCTGTAACCTTTTGGCT 1256
1204 CTTCTGCCATCATATACATCGGGAACCTTCTGACAGTTGTTTGTCTCGAG 1253
1257 CTTCTGCCATCATATGCTGGAACCTCTAGCGCTTGTGTTGCTCGAG 1306
1254 CCGGCTGGAGGAACACTATCGGACATGATTAATCTGCTGCTCTTCTC 1303
1307 CCGGCTGGAGCAAGGCTCATCGGAACATGCAATCTGCTGCTCTCGC 1356
1304 GGAATATATACATTTTCCATGCTGCTAGTGTGCTGCTTAACCTGATT 1353
1357 GGAATATATACATTTTCCATGCTGCTAGGCTGCTAGTCCCACTGGATC 1406
Beginn des X Genes
1354 CTTTCGCGGACGCTCTTTGCTAGCTCGGCTCGGCTGAATCTTGCGGA 1403
1407 CTTTCGCGGACGCTCTTTGTTTACGTTCCGCTGGGCTGAATCCGCGGA 1456
1404 CGA.CCCTCCGCGGCGCTT.GGACTCTATCTGCTCCCTCTGCTGCTC 1451
1457 CGACGCTCTCGGCGGCTGTTGGACTCTCTGCTCCCTCTCTGCTTGC 1506
1452 CPTACGCTCGACACAGGGCGCACTCTTTAGCGGCTTCCGCTC 1501
1507 CPTTCCAGCGCACACAGGGCGCACTCTTTAGCGGCTTCCGCTC 1556
1502 GTTCTACTCATCTGCGGCTGCTGATCACTTTGCTTACGCTCTCGAGA 1551
1557 GTGCTTCTCATCTGCGGCTGCTGATCACTTCTGCTTCACTCTGAGCT 1606
viral<>zellulär
1552 CGCATGGAAGGCACTCCCATGAAC.....A 1578
1607 TGCAT.....GGCGACCACTGGAACGCCCATAGATCTCTGCCCAAGT 1650
1579 CTTTACATAAGTCTCTCTGNACT 1602
1651 CTTACATAAGGACTCTTGGACT 1674

Abb. 17 Bereich viraler Sequenzen in pcAL-36

Die Sequenz von pcAL-36 (obere Sequenzzeile) wurde mit der des HBV Genoms, Subtyp adw (untere Sequenzzeile), verglichen. Die Homologie beträgt 94,9 % und beginnt bei den Positionen 271 (pcAL-36) bzw 320 (HBV) und endet bei den Positionen 1555 (pcAL-36) bzw. 1611 (HBV). Eingezeichnet sind Anfang und Ende viraler Sequenzen, der erste Exon/Exon-Übergang sowie S- und X-Genbereich des HBV Genoms.

1.3.2.3.4 Flankierende zelluläre Sequenzen am 5' Ende von pcAL-36

Wie bereits erwähnt, wurde am 5' Ende der cDNA eine nicht virale Sequenz identifiziert. Diese Sequenz weist eine Homologie von 94,1 % zu dem mitochondrialen Leserahmen URF4, Nukleotide 11135 - 10890 auf (unidentified reading frame 4; inzwischen identifiziert als ein Enzym aus dem Komplex I der Atmungskette; Chomyn, 1985; Abb. 18). Die Sequenz hat H-Strang Polarität. Da im Mitochondrium der H-Strang der kodierende Strang ist, hat der mitochondriale Teil der AL-36 mRNA (-)-Strang Polarität, ist also eine antisense mRNA. Anschließend an die mitochondrialen Sequenzen folgen bis zum Beginn der viralen Sequenzen 18 bp, die zu keiner bisher bekannten Sequenz homolog sind.

```

1  GGGTGGTTTCGAAGAAGANNITGTAATAATGATTACGTTCTGTGGCTGTG 50
   |||
11135 GTGTGGTTTCGAAGAAGATA..TAAATATGATTA.GTTCGTGGCTGTG 11089
   |||
51  AATGCTTATAATTAAAGAGATTGTAGGGAGATTAGTATAGAGAGGTAGA 100
   |||
11088 AATG.TTATAATTAAGGAGATTGTAGGGAGATTAGTATAGAGAGGTAGA 11040
   |||
101  GTCTTCTCGTGATAGTGGTTCATCGGATAAGTGGCGTTGGCTTGCCATG 150
   |||
11039 GTTTTTTTCGTGATAGTGGTTCACCTGGATAAGTGGCGTTGGCTTGCCATG 10990
   |||
151  CATGTGTAGGGGGCTAGGAGTCAGTAGTTAGTATTAGGAGGGGGTTGGC 200
   |||
10989 .ATTGTGAGGGG.TAGGAGTCAGGTAGTTAGTATTAGGAGGGGGTTGTG 10942
   |||
201  TAGGGGTGAGAGGAAAAGGTTGGGGCCAGCTAAATAGGTTTATCCCAAA 251
   |||
10941 AGGGGGTCGGAGGAAAAGGTTGGGGAACGCTAAATAGGTTGTTGTTGAT 10891
   |||
      Exon/Exon Übergang
252 CCTTTCTCGACCCCTAAGGCC 277
   |||
10890 TTGGTTTAAAAATAGTAGAGG 10865

```

Abb. 18 Bereich zellulär flankierender Sequenzen am 5' Ende von pcAL-36

Verglichen wurde die Sequenz von pcAL-36 (obere Sequenzzeile) mit der des menschlichen mitochondrialen Genoms (untere Sequenzzeile), wobei eine Homologie von 94,1 % der Nukleotide 1 - 251 von pcAL-36 mit den Nukleotiden 11135 - 10890 des H-Stranges des Mitochondriengenoms (Bereich des URF4) gefunden wurde. 18 Nukleotide vor dem zellulär-viralen Übergang (Position 250 - 268) sind zu keiner bisher bekannten Sequenz homolog. Eingezeichnet ist der Exon/Exon-Übergang, bei dem die viralen Sequenzen beginnen.

Das Vorhandensein dieser mitochondrialen Sequenzen in pcAL-36 erklärt die starke Hybridisierung mit der 5,5 kb großen Bande in dem Southern Blot (Abb. 13 B). Hier wurde gesamtzelluläre DNA aufgetragen, welche auch mitochondriale DNA enthält, die in 500 - 1000 Kopien je Zelle vorkommt. Die mitochondriale Sequenz aus pcAL-36 hybridisiert mit der entsprechenden Sequenz des Mitochondriengenoms, welche nach Restriktion mit HindIII in einem 5465 bp großen Fragment vorliegt (Restriktionsmuster nach der Sequenz des Mitochondriengenoms, Anderson, 1981).

Wenn pcAL-36 tatsächlich ein Transkript der genomischen Klone AL10.5 oder AL10.7 repräsentiert, ist das Auftreten der mitochondrialen Sequenzen mit einer kolinear transkribierten, nicht prozessierten mRNA nicht vereinbar, denn in beiden Klonen sind die HBV-Sequenzen länger als 1285 bp. Während also die 3' flankierenden zellulären Sequenzen der AL-36 mRNA mit AL10.5 und AL10.7 übereinstimmen, ist das 5' Ende unterschiedlich. Bei Position 271, dem Übergang zur viralen Sequenz, befindet sich in pcAL-36 jedoch wieder das Basentriplett AGG, welches auf ein Spleißen auch an dieser Stelle der mRNA hindeutet. In der HBV Sequenz befindet sich an dieser Stelle CAGT (Position 316), welches eine gewisse Verwandtschaft zu einer "splice acceptor" Stelle CAGG (Crick, 1979) aufweist. Die Basen C und A gehören zum Intron, während GG im Exon und damit in der mRNA (als AGG) auftritt. Da an dieser Stelle AGG in pcAL-36 vorliegt, ist eine Transition von T nach G in der integrierten HBV Sequenz wahrscheinlich, so daß hier vermutlich eine funktionsfähige "splice acceptor" Stelle entstanden ist.

1.3.2.4 Nachweis der AL-36 mRNA und der genomischen Sequenz

Im Folgenden sollten nun die oben dargelegten theoretischen Überlegungen, die sich aus der Sequenz von pcAL-36 ergaben, durch Experimente belegt werden. Dazu gehörte erstens der Nachweis der AL-36 mRNA als ein Transkript, welches mit allen Bereichen der cDNA hybridisiert sowie zweitens der Nachweis der genomischen Sequenzen, welche bei geeigneter Wahl der Restriktionsenzyme im Southern Blot Banden unterschiedlicher Größe darstellen müssen, um ein Spleißen der mRNA zu belegen.

Durch den Nachweis der AL-36 mRNA in einem Northern Blot konnte gezeigt werden, daß es sich bei pcAL-36 nicht um ein Klonierungsartefakt handelt. Der Nachweis ist dann erbracht, wenn die drei als Exons erkannten Abschnitte der cDNA mit der gleichen Bande im Northern Blot hybridisieren. Dementsprechend wurden drei Sonden verwendet, die in Abb. 23 skizziert sind. Sonde a umfaßt die Nukleotide 1 - 89 bis zur 1. HinfI Schnittstelle des cDNA Klones und repräsentiert damit die mitochondrial-ähnlichen Sequenzen. Die Sonde c entspricht dem 3' Ende der cDNA von

der letzten *AccI* Schnittstelle der cDNA bei Nukleotid 1755 bis zum 3' Ende und enthält die unbekannten zellulären Sequenzen. Zum Nachweis der viralen Sequenzen wurde eine HBV Sonde (gesamtes Genom) verwendet.

Mit dem Northern Blot, auf dem mRNA aus der PLC/PRF/5 Zelllinie aufgetragen wurde (Abb. 19), konnte gezeigt werden, daß die Sonde c mit einer Bande von 2 kb Länge hybridisiert. Diese Bande wird auch von der HBV Sonde und von Sonde a erkannt. HBV spezifische mRNAs von 2,6 kb traten zusätzlich auf. Auch von Sonde a wurde eine zusätzliche mRNA von ca. 2,2 - 2,3 kb erkannt. Letztere konnte jedoch auch in der CCL13 Zelllinie, welche keine HBV Integrate enthält, nachgewiesen werden und stellt somit keine HBV Hybrid-mRNA dar. Die etwa 2 kb lange mRNA hybridisiert als einzige mit allen drei Sonden und stellt somit die AL-36 mRNA dar. Die zunächst ungewöhnliche Sequenz von pcAL-36 ist also nicht durch ein Klonierungsartefakt entstanden, sondern liegt in gleicher Weise tatsächlich in der AL-36 mRNA vor.

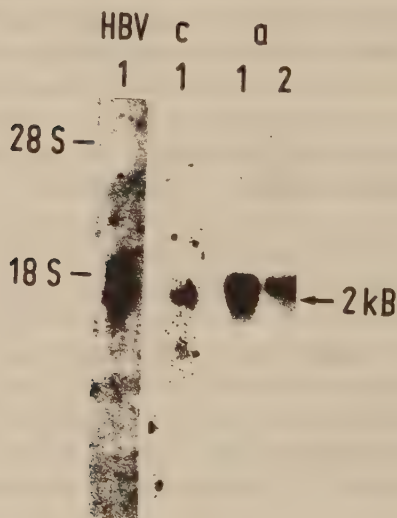


Abb. 19 Identifizierung der AL-36 mRNA durch Northern Analyse

Je 2 µg Poly A⁺ RNA (E2.7.3) aus PLC/PRF/5 Zellen (Spuren 1) und CCL13 Zellen (Spur 2) wurden mit Glyoxal denaturiert auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (E2.8), auf Nitrozellulose transferiert (E2.9) und mit den Sonden HBV, c (zellulär flankierende Sequenzen) und a (mitochondriale Sequenzen; s. Abb. 23) hybridisiert (E2.14). Als Größenmarker wurden ribosomale 28 S und 18 S RNAs verwendet.

Zum Nachweis der genomischen Sequenzen zu pcAL-36 wurden Southern Blots mit HindIII geschnittener genomischer DNA der Zelllinie PLC/PRF/5 und CCL13 bzw. huH4 mit den oben erwähnten Sonden a und c sowie mit zwei weiteren Sonden b und bc (Abb. 23) hybridisiert (Abb. 20). Sonde b erstreckt sich von der Ava II Schnittstelle bei Position 1522 des cDNA Klonen bis zur AccI Schnittstelle bei Pos. 1755 und enthält die zu AL10.5 und AL10.7 homologen Sequenzen. Sonde bc umfaßt die Sequenzen von Sonde b und Sonde c, also den gesamten flankierenden, nicht viralen Teil von pcAL-36. Mit Sonde a wurde das gleiche starke Signal bei 5,5 kb in allen HindIII geschnittenen, genomischen DNAs gefunden, welches schon bei der Hybridisierung mit der gesamten cDNA pcAL-36 aufgetreten ist (Abb. 13 B) und von den Sequenzen des mitochondrialen Genoms herrührt. Außerdem wurden bei längerer Exposition des Filmes Banden von 3,9, 3,5, 2,5 und 1,8 kb in HindIII geschnittener PLC/PRF/5 DNA und Banden von 4,1, 3,5 und 3,0 kb in CCL13 DNA nachgewiesen. Diese Banden entsprechen ihrer Intensität nach genomischen Sequenzen mit einer oder wenigen Kopien und stellen daher nukleäre Kopien mitochondrialer Gene dar. Da alle diese dargestellten Banden kleiner sind als 5,5 kb, kann es sich nicht um einen Partialverdau bei der Restriktion handeln. In das Kerngenom integrierte Kopien mitochondrialer Gene, u.a. des URF4 sind bereits früher beschrieben worden (Fukuda, 1985; Nomiyama, 1984; Wakasugi, 1985), und man geht davon aus, daß mehrere Kopien der einzelnen Gene über das ganze Kerngenom verteilt vorliegen (Fukuda, 1985). Zusätzliche genomische Banden zwischen 4,5 und 6,5 kb wären auf diesem Blot nicht nachzuweisen, da sie von der intensiven Bande mitochondrialer Sequenzen überdeckt sind.

Um die Hybridisierung eines Southern Blots mit Sonde a ohne die starken Banden mitochondrialer Sequenzen durchführen zu können, wurde versucht, nukleäre DNA zu präparieren, welche frei von mitochondrialer DNA ist. Dazu wurde die chromosomale DNA aus zuvor isolierten Zellkernen extrahiert (2.10.6). Diese DNA und zum Vergleich dazu Gesamtzell-DNA wurde unverdaut und mit HindIII, EcoRI oder BamHI restringiert auf einem Southern Blot mit der Sonde a hybridisiert. Es stellte sich heraus, daß in unverdauter zellulärer Gesamt-DNA zwei Typen mitochondrialer DNA zu finden sind (Abb. 21). Die Bande bei 16,6 kb entspricht der mitochondrialen Genomlänge, während die Bande höheren Molekulargewichtes Konkatemere der Mitochondrien DNA darstellt. Solche Konkatemere sind in nukleärer DNA nicht mehr vorhanden, wohl aber mitochondriale Sequenzen von 16,6 kb. Vermutlich entspricht die 16,6 kb Bande Mitochondriengenomen, die sich als freie DNA im Zellkern befinden, wie für HeLa Zellen gezeigt werden konnte (Kristensen, 1986). Nach Verdau von Gesamt-DNA und nukleärer DNA entsteht das gleiche Bild intensiver Banden mitochondrialer Sequenzen (Abb. 21). Da das Vorkommen integrierter URF4 Sequenzen im Kerngenom bereits dokumentiert ist (Fukuda, 1985) und der Nachweis, daß es sich bei pcAL-36 nicht um ein Klonierungsartefakt handelt, durch Northern Hybridisierung erbracht werden konnte, wurde auf den

Nachweis nukleär mitochondrialer Signale in dem Bereich der intensiven Banden mitochondrialer DNA verzichtet.

Zum Nachweis der genomischen Sequenz, welche dem 3' Ende von pcAL-36 entspricht, wurde ein Southern Blot mit HindIII verdauter DNA aus PLC/PRF/5 Zellen und huH4 Zellen mit den Sonden b, c, und bc hybridisiert (Abb. 20). Da die Sonden b und bc 30 Nukleotide der HBV Sequenzen enthalten, wurden diese Sonden mit einem 50fachen molaren Überschuß von nicht markierter HBV DNA präabsorbiert, um eine Hybridisierung an integrierte HBV Sequenzen zu vermeiden. Mit der Sonde b werden Banden von ca. 10 kb, 18 kb und 25 kb, mit der Sonde c eine Bande von etwa 5,3 kb und mit der Sonde bc entsprechend alle vier Banden erkannt. Sonden b und c erkennen keine gemeinsame Bande, obwohl sie im pcAL-36 benachbart sind und sich in diesem Bereich keine HindIII Schnittstelle befindet. In der chromosomalen DNA liegen diese Sequenzen offensichtlich weiter voneinander entfernt und können durch Restriktion mit HindIII getrennt werden. Es muß sich hier um 2 Exons handeln, die durch Spleißen miteinander verbunden worden sind. Dies steht im Einklang mit den Sequenzdaten (1.3.2.3.2).

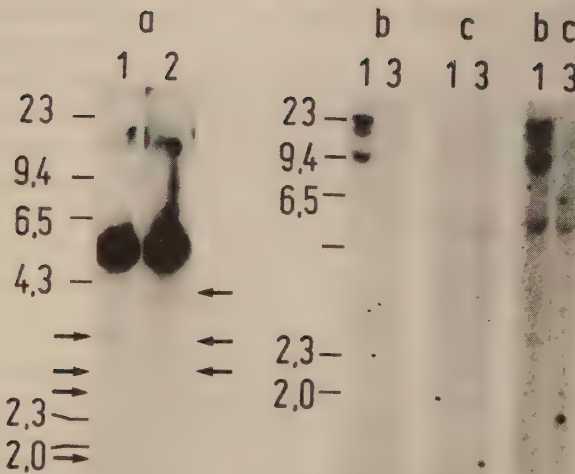


Abb. 20 Southern Analyse genomischer DNA mit verschiedenen Bereichen von pcAL-36

10 µg genomischer DNA aus PLC/PRF/5 (Spuren 1), CCL13 (Spur 2) und huH4 (Spuren 3) wurden mit HindIII verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt (E2.11), auf Nitrozellulose transferiert (E2.12.) und mit den angegebenen, 32 P-markierten Sonden (s. Abb. 23) hybridisiert (E2.14). Da die Sonden b und bc 30 Nukleotide HBV Sequenzen enthalten, wurden sie mit einem 50fachen molaren Überschuß an HBV DNA präabsorbiert, um ein Hybridisieren dieser Sequenzen zu vermeiden. Als Größenmarker sind die Fragmentlängen HindIII verdauter Lambda DNA angegeben.

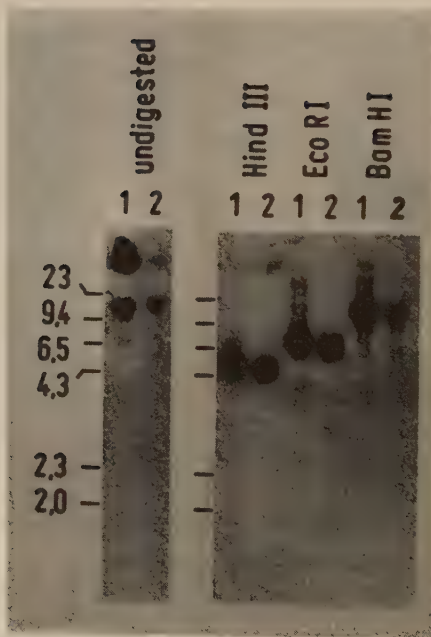


Abb. 21 Southern Analyse gesamtzellulärer und nukleärer DNA der PLC/PRE/5 Zelllinie

10 µg Gesamt-DNA (E2.10.5; Spuren 1) oder nukleärer DNA (E2.10.6; Spuren 2) wurden unverdaut bzw. mit HindIII, EcoRI oder BamHI restringiert auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (E2.11), auf Nitrozellulose transferiert (E2.12) und mit der ^{32}P -markierten Sonde a (Abb. 23) hybridisiert (E2.14). Als Größenmarker sind die Fragmentlängen HindIII restringierter Lambda DNA angegeben.

1.3.2.5

Mögliche Expressionssignale für die AL-36 mRNA

Da die Klone AL10.5 und AL10.7 an einer ungewöhnlichen HindIII Schnittstelle in HBV Sequenzen beginnen (Koch, 1984), sind die genomischen Sequenzen, von denen aus die AL-36 mRNA transkribiert wird, nicht bekannt, ebensowenig die 5' von der Startstelle gelegenen regulatorischen Sequenzen. Unter der Annahme jedoch, daß im Kern ein längeres Fragment mitochondrialer Sequenzen integriert ist, ist das Expressionssignal für die Transkription der AL-36 mRNA auf diesem Fragment zu suchen. Da die Sequenz des mitochondrialen Genoms vollständig bekannt ist, wurden 600 bp 5' des Beginns der cDNA (Position 11735 - 11136) auf Regulationssequenzen hin untersucht. In diesem Sequenzbereich befindet sich eine GC reiche Region bei Position 11670 (-535 zur cDNA), die Sequenz CAAT bei Position 11568 (-433 zur cDNA) und eine TATA Konsensus Sequenz (TATAATTAT) bei Position 11522 (-387 zur cDNA). Bei Position 11479 (-344 zur cDNA) folgt ein möglicher Transkriptionsstart (Pyrimidin, Purin, Pyrimidin, TAT). Falls diese Sequenzen im Kern tatsächlich vorkommen, wäre eine Transkription der AL-36 mRNA ausgehend von diesem Promotor möglich. Die mRNA wäre dann unter Berücksichtigung aller Spleißmöglichkeiten mindestens 2250 Basen lang und die aus dem Northern Blot ermittelte Größe von 2 kb müßte entsprechend auf 2,25 kb korrigiert werden. Abb. 22 gibt die Sequenz in dieser Promotorregion wieder.

```

TCCTTGAGAG AGGATTATGA TGCAGCTGTG AGTCCGTTTCGTAGTTTGAGT
TTGCTAGGCCA GAATAGTAAT GAGGATGTAA GCGCGTGGGC GATTATGAGA
ATGACTGCGC CGGTGAAGCT TCAGGGGGTT TGGATGAGAA TGGCTGTTAC
TACGAGGGCT ATGTGGCTGA TTGAAGAGTA TGCAATGAGC GATTTTAGGT
CTGTTTGTCTG TAGGCAGATG GAGCTTGTGA TAAATTATGCC TCATAGGGAT
AGTACAAGGA AGGGGTAGGC TATGTGTTTT GTCAGGGGGT TGAGAATGAG
TGTGAGGCGT ATTATACCAT AGCCGCCTAG TTTTAAGAGT ACTGCGGCAA
GTACTATTGA CCCAGCGATG GGGGCTTCGA CATGGGCTTT AGGGAGTCAT
AAGTGGAGTC CGTAAAGAGG TATCTTTACT ATAAAAGCTA TTGTGTAAGC
TAGTCATATT AAGTTATTGG CTCAGGAGTT TGATAGTTCT TGGGCAGTGA
GAGTGAGTAG TAGAATGTTT AGTGAGCCTA GGGTGTGTG AGTGTAATTT
AGTGCATGA GTAGGGGAAG GGAGCCTACT AGGGTGTA GAATAGGAAGTA
TGTGCCTGCG TTCAGGCGTT CTGGCTGGTT GCCTCATCGG GTGATGATG
CCAAGTGCG GATAAG
          Beginn der cDNA Sequenz

```

Abb. 22 Promotorsequenz für die Expression der AL-36 mRNA

Abgebildet ist der mitochondriale H-Strang von Position 12800 - 11135, der möglicherweise 5' der cDNA Sequenz im Genom lokalisiert ist. Eingezeichnet sind die Promotor-Konsensus-Sequenzen CAAT und TATA sowie die GC reiche Region und der Transkriptionsstart TAT.

Möglicherweise lag im Genom die in Abb. 23 skizzierte Anordnung der Sequenzen vor, die nach Transkription und Spleißen zur Entstehung der mRNA AL-36 geführt hat. Die HBV Integration hätte somit 3' der mitochondrialen Sequenzen stattgefunden. Durch Transkription einer Hybrid mRNA ausgehend von einem Promotor in den mitochondrialen Sequenzen und anschließendem Spleißen kann die AL-36 mRNA entstanden sein.

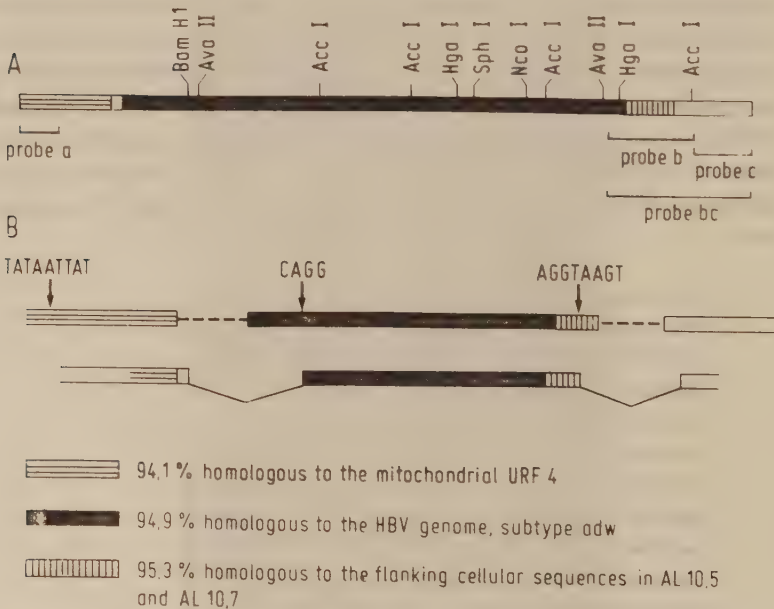


Abb. 23 Physikalische Karte von pcAL-36 und mögliche Organisation der genomischen Sequenzen

A: Restriktionskarte von pcAL-36 mit einer Zusammenfassung der Homologiebereiche zu dem mitochondrialen Leserahmen URF4, HBV und den zu flankierenden Sequenzen AL10.5 und AL10.7. Darunter sind die für Southern- und Northern Blots verwendeten Sonden eingezeichnet.

B: Mögliche genomische Organisation der Sequenzen, von denen die AL-36 mRNA transkribiert wurde. Der hypothetische Promotor (TATAAATTAT) sowie die nachgewiesenen Spleiß-Konsensussequenzen (CAGG und AGGTAAGT) sind eingezeichnet. Darunter ist die Lage der Exons und der Mechanismus des Spleißens angegeben.

1.3.2.6

Leserahmen in AL-36

Mitochondriale Gene haben einen anderen genetischen Code als kernkodierte Gene (Buetow, 1978). Mitochondriale Sequenzen können in der Regel im Cytoplasma nicht translatiert werden, da jedes mitochondriale Kodon für Tryptophan einen Translationsstop bewirkt. Dementsprechend sind alle Leserahmen, die im mitochondrialen Teil von AL-36 beginnen, nur zwischen 9 und 15 bp lang. Der erste Leserahmen signifikanter Länge beginnt erst am 4. ATG Startkodons (Position 332 der cDNA), bereits im Bereich der HBV Sequenz. Er ist 597 bp lang (199 AS) und liegt im S-Leserahmen des HBV Genoms. Durch eine Insertion von einem Nukleotid bei Position 439 tritt eine Rasterverschiebung über 131 bp auf, danach wird sie durch eine Deletion eines Nukleotides bei Position 570 wieder aufgehoben. Theoretisch würde hier ein 5' trunkiertes und über 44 AS verändertes HBsAg entstehen. Da eine effiziente Translation vom vierten ATG Startkodons einer mRNA in der Regel nicht möglich ist, kommt dieser Leserahmen nicht für eine Erklärung der HBsAg Expression der PLC/PRF/5 Zelllinie in Frage. Ein zweiter längerer Leserahmen beginnt mit dem 6. ATG (Position 414) und erstreckt sich über 372 bp (124 AS). Er liegt nicht in einem der HBV Leserahmen. Durch die oben erwähnte Rasterverschiebung springt er jedoch für 131 bp in den HBV Leserahmen des Polymerasegens. Ein dritter Leserahmen von 570 bp (190 AS) beginnt mit dem 19. ATG bei Position 1089. Auch er liegt nicht in einem HBV Leserahmen. Durch eine Folge von Deletionen zwischen Position 1102 und 1124 fehlen insgesamt 6 Nukleotide des HBV Genoms, was nicht zu einer Rasterverschiebung führt. Weitere Deletionen bei Position 1407 und 1424 verschieben den Leserahmen um -2, jedoch kommt es dadurch nicht zur Translation in einem HBV Leserahmen. Dieser letzte Leserahmen reicht in den Bereich der flankierenden zellulären Sequenzen. Die anderen offenen Leserahmen in pcAL-36 (weitere 10) sind zwischen 2 und 43 Aminosäuren lang. Die Lokalisation der beschriebenen längeren Leserahmen ist in Abb. 24 zusammengefaßt. Wenn die AL-36 mRNA von dem oben beschriebenen Promotor aus transkribiert werden sollte, so befänden sich auf der mRNA noch 5 weitere ATG Startkodons, die in der cDNA nicht vertreten sind, so daß der zuerst beschriebene Leserahmen sogar erst am 9. ATG beginnen würde. Insgesamt ist eine effiziente Translation von AL-36 mRNA also nicht zu erwarten. Dies sollte im Folgenden in vitro überprüft werden.

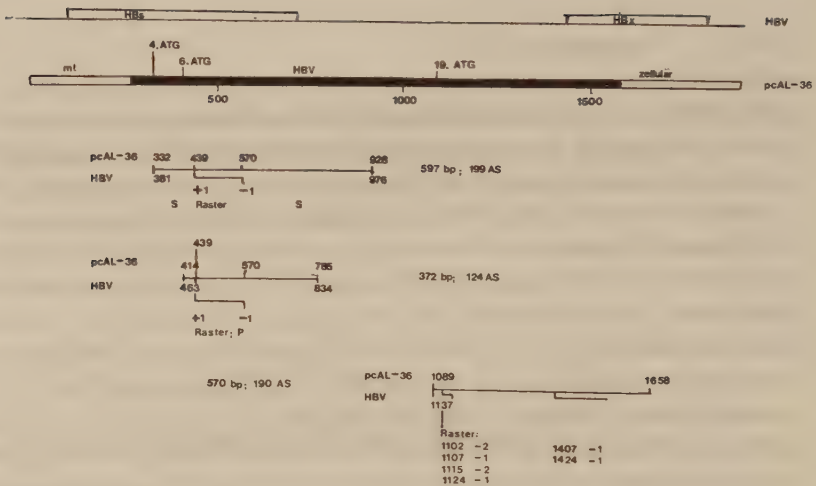


Abb. 24 Leserahmen mit mehr als 50 Aminosäuren in pcAL-36.

Angegeben sind jeweils das ATG-Startkodon, an welchem das hypothetische Protein beginnen könnte, der Leserahmen im Vergleich zu den HBV Leserahmen sowie Rastermutationen.

1.3.2.6.1 Überprüfung der Translationsprodukte von der AL-36 mRNA in vitro

Um mögliche Translationsprodukte von pcAL-36 in vitro zu identifizieren, wurde eine cRNA hergestellt und diese in vitro translatiert. Dazu wurde das Insert von pcAL-36 in den Plasmidvektor "bluescribe" rekloniert. Dieses Plasmid enthält beiderseits des Polylinkers die Promotorsequenzen für T3- bzw T7-RNA-Polymerase. Je nach Orientierung des klonierten Fragmentes und Wahl der Polymerase können "sense" und "antisense" mRNAs in vitro hergestellt werden. Im Fall von pcAL-36 wurde mit T7-RNA-Polymerase eine "sense" mRNA hergestellt. Diese wurde mit einem nukleasebehandelten Retikulozytenlysat in vitro translatiert. Als Kontrolle wurde Brome Mosaic Virus RNA translatiert, was sehr effizient gelang. Mit der cRNA von AL-36 war jedoch, wie zu erwarten, kein Translationsprodukt nachzuweisen.

Die biologische Funktion der AL-36 mRNA und ihre Bedeutung in der Onkogenese muß damit ungeklärt bleiben.

1.4

Zwischenzusammenfassung

Aus der humanen Hepatomzelllinie PLC/PRF/5 wurden drei cDNA Klone charakterisiert, zwei von ihnen wiesen ausschließlich identische Sequenzen aus dem S-Genbereich des HBV auf. Die Charakteristika des dritten cDNA Klones pcAL-36 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. pcAL-36 repräsentiert 1,9 kb der entsprechenden mRNA von 2 - 2,3 kb.
2. Die AL-36 mRNA ist eine HBV-Hybrid-mRNA, bestehend von 5' nach 3' aus kerngenomischen mitochondrialen Sequenzen, HBV Sequenzen und zellulären Sequenzen.
3. Die mitochondrialen Sequenzen (Position 1 - 251 entsprechen einem Teil der kodogenen Sequenz des in das Kerngenom integrierten URF4 und haben daher (-)Strang Polarität. Es folgen 18 bp zellulärer Sequenzen.
4. HBV Sequenzen (Position 271 - 1550) beginnen bei Position 217 des HBV Genoms und umfassen den S-Genbereich ohne das 5' Ende, die Promotor und Enhancer Region und das X-Gen ohne das 3' Ende.
5. 124 bp zellulärer Sequenzen (Position 1551 - 1675) sind homolog zu den flankierenden zellulären Sequenzen der genomischen Klone AL10.5 und AL10.7, welche identische Sequenzen über 187 bp aufweisen. Die AL-36 mRNA ist daher vermutlich ein prozessiertes Transkript eines dieser Integrate. Die restlichen zellulären Sequenzen (Position 1676 - 1895) sind zu keiner bekannten Sequenz homolog.
6. Die AL-36 mRNA ist zweimal gespleißt. Die entsprechenden Konsensussequenzen befinden sich am 5' Ende der HBV Sequenzen und zwischen den AL10.5/AL10.7 homologen und den neuen zellulären Sequenzen.
7. Auf der mitochondrialen Sequenz, die vermutlich 5' der cDNA Sequenz im Kern integriert ist, konnte durch Computeranalyse ein Promotor lokalisiert werden, der die Expression der AL-36 mRNA steuern könnte.
8. Eine Translation der mRNA in ein Protein signifikanter Länge ist im Cytoplasma unwahrscheinlich, da sich mehrere Stopkodons im Bereich der mitochondrialen Sequenzen befinden.

2. IDENTIFIZIERUNG EINES TUMORASSOZIIERT EXPRIMIERTEN ANTIGENS IN DER PLC/PRF/5 ZELLINIE

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten Antigene identifiziert und charakterisiert werden, die als Ursache oder Folge der malignen Entartung einer Leberzelle exprimiert werden. Definitionsgemäß sollte ein solches Antigen eine starke Expression in Hepatomzellen und möglicherweise anderen Tumoren und keine oder nur eine schwache Expression in normalen Leberzellen und anderen normalen Geweben zeigen und somit tumorspezifisch sein. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden monoklonale Antikörper gegen PLC/PRF/5 Zellen hergestellt und auf ihre Reaktivität gegen eine Reihe normaler und maligner Zelllinien und Gewebe humanen und animalen Ursprungs überprüft. Für diese Untersuchungen wurde die HBV positive PLC/PRF/5 Zelllinie gewählt, um auch solche Antigene zu identifizieren, die als Folge der HBV Integration exprimiert werden.

2.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen PLC/PRF/5 Zellen

Um eine Bank monoklonaler Antikörper gegen PLC/PRF/5 Zellen zu erhalten, wurden Balb/c Mäuse mit diesen Zellen immunisiert (E2.3.1). Durch die Verwendung ganzer, mit EDTA aus der Kulturschale abgelöster Zellen wurde begünstigt, daß alle Antigene in einer nativen Form dem Immunsystem der Maus präsentiert wurden. Dies war insofern wichtig, als die generierten Antikörper dazu geeignet sein sollten, die in einer Expressions-cDNA Bank klonierten Sequenzen zu erkennen. Abgesehen von Unterschieden in der Sekundärstruktur, die durch eine andere Prozessierung der Proteine in *E. coli* entstehen, liegen die Proteine in der exprimierten cDNA Bank in einer nativen Form vor.

Der Antikörpertiter im Serum der Mäuse wurde im ELISA bestimmt (E2.5.2), wobei PLC/PRF/5 Gesamtzellsat als Antigenmischung verwendet wurde. Nach der dritten Immunisierung wurden im allgemeinen Titer von mindestens 1:2000 erreicht. Da anzunehmen war, daß die Milzzellen derjenigen Maus am stärksten stimuliert waren, welche den höchsten Antikörpertiter aufwies, wurde diese für eine Fusion getötet und die Milz entnommen. Die Milzzellen wurden mit Mausmyelomzellen (AG8-653; Kearney, 1979) fusioniert (E2.3). Dabei wurden ca. 300 wachsende Klone in 238 "Wells" der Kulturplatten erhalten.

Die Medienüberstände der einzelnen Klone wurden in einem Western Blot (E2.5.1) auf Gehalt an Antikörpern gegen PLC/PRF/5 Proteine überprüft. Als Kontrolle für eine mögliche Tumorspezifität dienten Extrakte aus normalen Leberzellen. Diese Methode hatte den Vorteil, daß auf Antikörper

selektioniert wurde, die eine Reaktivität im Western Blot zeigten. Nur solche Antikörper eignen sich auch für die Identifizierung von Klonen einer cDNA Bank, da auch hier die Proteine an Nitrozellulose gebunden vorliegen.

Von den 238 getesteten Medienüberständen zeigten 98 eine Reaktivität im Western Blot. Die meisten dieser Antikörper erkannten Proteine zwischen 35 und 45 kD, welche auch in normalen Leberzellen nachgewiesen werden konnten, so daß diese Antikörper nicht als tumorspezifisch bezeichnet werden können. Diese Hybridomzellen wurden weder kloniert noch wurden die Antigene weiter untersucht.

2.2 Identifizierung eines tumorspezifischen Antigens mit einem monoklonalen Antikörper

Insgesamt konnten fünf Hybridomklone identifiziert werden, die in einem ersten Test nicht mit normalen Leberproteinen reagierten. Diese Zellen wurden kloniert (E2.3.5), da durch Chromosomensegregation ein gewisser Prozentsatz der Zellen keine Antikörper mehr produzieren. Vier der Klone verloren ihre Produktivität bereits in der ersten Klonierungsrunde, ein Klon konnte stabil etabliert werden. Er wird im Folgenden mAk PLC-43 genannt, das erkannte Antigen PLC-43.

MAk PLC-43 erkennt im Western Blot ein Protein von etwa 43 kD (p43) (vergl. Abb. 24).

2.2.1 Bestimmung des Subtyps des monoklonalen Antikörpers

Um den Antikörper isolieren zu können, war es notwendig, den Immunglobulin Subtyp zu bestimmen. Dazu wurde eine ELISA Platte mit dem Mediumüberstand der mAk PLC-43 Hybridomazellen beschichtet. Anschließend wurde ein ELISA (E2.5.2) mit subtypspezifischen Antiseren durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß es sich bei mAk PLC-43 um ein Immunglobulin der Klasse IgG2b handelt.

2.3 Charakterisierung der Expression von PLC-43

Es wurde zunächst versucht, ein genaues Bild über das Expressionsmuster des Antigens PLC-43 zu erhalten, um eine mögliche Tumorspezifität erhärten zu können. Zu diesem Zweck und um das Antigen in eine der drei Klassen tumorspezifischer Proteine (vergl. B10.) einordnen zu können,

wurden Proteinextrakte aus verschiedenen Tumorzelllinien und Tumoren sowie aus normalen Geweben im Western Blot mit mAk PLC-43 getestet.

2.3.1 Expression von PLC-43 in humanen Hepatomzelllinien, Hepatomen und normalem menschlichen Lebergewebe

Um zu untersuchen, ob PLC-43 generell in malignem Lebergewebe oder daraus etablierten Zelllinien exprimiert wird und ob in gesundem Lebergewebe keine Expression nachzuweisen ist, wurden HBV positive und negative humane Hepatomzelllinien, humane Hepatomgewebe, von denen der HBV Status nur zum Teil bekannt war, Peritumorgewebe und gesundes Lebergewebe sowie eine nach akuter Hepatitis B explantierte, zirrhotische Leber im Western Blot (E2.5.2) auf die Expression von PLC-43 untersucht. Die Untersuchung von Murmeltier ("woodchuck") Hepatom-, Peritumor- und Lebergewebe sollte zeigen, ob es sich um ein in der Evolution konserviertes Antigen handelt.

2.3.1.1 Expression in humanen Hepatomzelllinien

Um zu überprüfen, ob die Expressionsrate von PLC-43 mit dem HBV Status einer Hepatomzelle korreliert, wurden die vier HBV positiven Hepatomzelllinien PLC/PRF/5 (7 Integrate; Alexander, 1956), Hep3B (2 Integrate; Aden, 1979), huH4 (1 Integrat; Huh, 1981) und huH1 (4 Integrate; Huh, 1981) sowie die drei HBV negativen Hepatomzelllinien HepG2 (Aden, 1979), huH7 (Nakabayashi, 1982) und Mahlawu im Western Blot mit mAk PLC-43 verglichen (Abb. 24). Das Ergebnis zeigte eine deutlich stärkere Expression in drei der vier HBV positiven Zelllinien (PLC/PRF/5, huH1, Hep3B) gegenüber den HBV negativen und der vierten HBV positiven Zelllinie (huH4). Dies läßt darauf schließen, daß die Expression von PLC-43 durch die HBV Integrate beeinflußt werden kann.

PLC-43 wird von diesen Zellen nicht ins Medium sezerniert, wie durch Analyse der Medienüberstände im Western Blot gezeigt werden konnte.

2.3.1.2 Expression von PLC-43 unter HBV-Einfluß

Um zu untersuchen, ob HBV die Expression von PLC-43 stimulieren kann, wurden die Zelllinien HepG2 und H2⁺ verglichen. H2⁺ wurde aus der HepG2 Zelllinie durch Transfektion mit einem Plasmid, welches ein HBV Tandem enthält, hergestellt (Sells, 1987). In H2⁺ Zellen liegt die HBV DNA integriert im Genom und zusätzlich in einer replikativen Form vor. In diesen Zellen konnte

eine deutlich höhere Expression gegenüber HepG2-Zellen festgestellt werden (Abb. 24), die möglicherweise auf eine Aktivierung durch die HBV Sequenzen zurückzuführen ist.

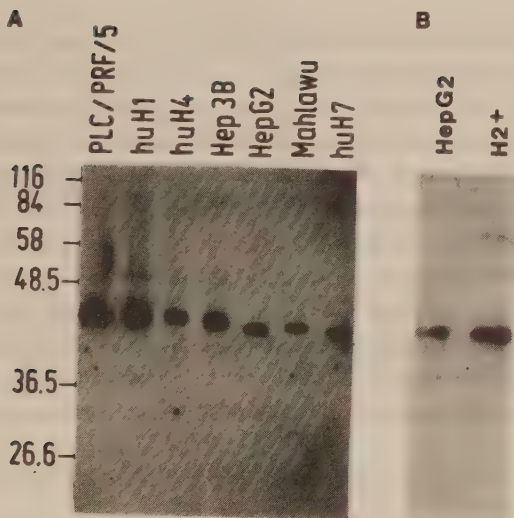


Abb. 24 Western Blot zum Nachweis der Expression von PLC-43 in humanen Hepatomzelllinien.

A: 20 µg Gesamtproteinextrakt (E2.4.1) aus den Zelllinien PLC/PRF/5, huH1, HuH4, Hep3B, HepG2, Mahlawu, huH7 und HepG2 15/1 wurden auf einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt (E2.4.4.1), auf Nitrozellulose transferiert und mit mAk PLC-43 und ^{125}I markierten anti Maus Immunglobulinen inkubiert (E2.5). Alle Proteinkonzentrationen wurden dreimal unabhängig in Doppelwerten bestimmt (E2.4.3).

B: Vergleich der Expression von PLC-43 in der ursprünglichen HepG2 Zelllinie und nach Transfektion mit HBV DNA (H2^+). Das Experiment wurde wie in A beschrieben durchgeführt. Die Expression von p43 in H2^+ ist gegenüber der ursprünglichen HepG2 Zelle deutlich erhöht.

Molekulargewichtsstandards sind in kD angegeben.

2.3.13 Expression von PLC-43 in PLC/PRF/5 Zellen nach Differenzierung mit Retinsäure

Um Aussagen darüber machen zu können, ob die Expression von PLC-43 in Hepatomzellen an den voll transformierten Zustand gebunden ist, wurden PLC/PRF/5 Zellen mit Retinsäure behandelt und anschließend auf die Expression des Antigens hin untersucht. Retinsäure unterdrückt die Malignität vieler Tumorzellen in vitro (Merriman, 1979) und führt zu einer Redifferenzierung (Breitman, 1980). Wenn die Expressionsrate mit dem Stadium der Malignität korreliert, so ist in diesem Experiment eine Abnahme der Expression zu erwarten.

Bei Zugabe von 10 μ M Retinsäure zum Kulturmedium von ca. 50 % konfluenten PLC/PRF/5-Zellen sank die im Cytoplasma nachweisbare Menge an p43 zeitabhängig ab. Bereits nach 2 h Retinsäurebehandlung war eine Basislinie der Expression erreicht, die auch bei weiterer Behandlung nicht mehr sank (Abb. 25). Dieser Zustand war für 24 h stabil, da auch nach Absetzen der Retinsäurebehandlung und Inkubation in normalem Medium in diesem Zeitraum die Expression nicht wieder anstieg. Es wurde darauf geachtet, daß sich die Zellen zu jedem Zeitpunkt des Experimentes aktiv teilten und daß Konfluenz der Kulturschale nie erreicht wurde, da ansonsten eine Abnahme der PLC-43 Menge auch mit einer verminderten Mitoserate zusammenhängen könnte. Die Zellmorphologie war auch nach einwöchiger Behandlung nicht offensichtlich verändert und die Zellen teilten sich weiterhin. Die Expressionsrate ist vergleichbar mit der, die in embryonalen, sich teilenden humanen Fibroblastenkulturen gefunden wurde (2.3.2; Abb. 28 C). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß eine Reduktion der Malignität auch eine Reduktion des PLC-43 Spiegels bewirkt.

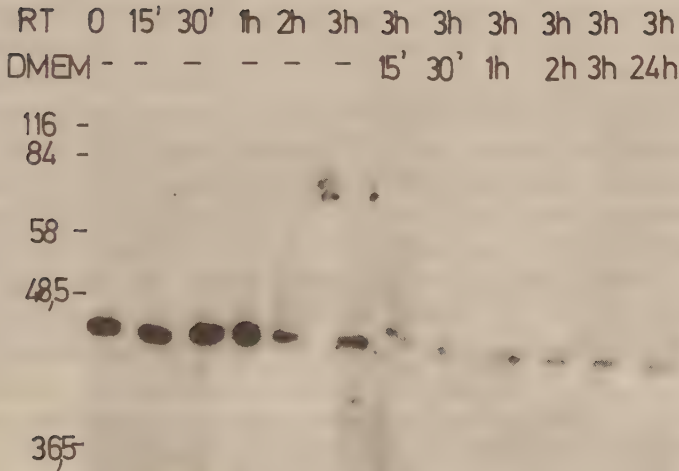


Abb. 25 Expression von PLC-43 nach Differenzierung mit Retinsäure

PLC/PRF/5 Zellen wurden für 15 Min., 30 Min, 1h, 2h oder 3h mit 10 uM Retinsäure im Kulturmedium behandelt. Nach 3h wurde für 15 Min., 30 Min., 1 h, 2h, 3h oder 24 h mit normalem Medium inkubiert. 10 ug cytoplasmatischer Proteinextrakt (E2.4.2) wurden auf einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt (E2.4.4.1), auf Nitrozellulose transferiert und mit mAk PLC-43 und 125 J-markierten anti-Maus Immunglobulinen inkubiert (E2.5.1) und autoradiographiert.

2.3.1.4 Expression in soliden HCCs, Peritumorgewebe und normalem Lebergewebe

Die Untersuchung soliden Tumorgewebes sollte einerseits zeigen, ob die Expression von PLC-43 ein Zellkulturartefakt ist, andererseits eine generelle Expression in malignen Leberzellen demonstrieren. Durch die Überprüfung einer Anzahl normaler Lebergewebe sollte die Tumorspezifität erhärtet werden. Bei allen untersuchten Geweben handelte es sich um Autopsiematerial, das 12 bis 24 h post mortem entnommen worden war. In 12 der 15 Hepatome konnte das Antigen nachgewiesen werden, in Geweben aus sechs normalen Lebern war gar keine und im Gewebe einer normalen Leber eine sehr schwache Expression nachzuweisen. Ebenso waren drei der fünf Peritumorgewebe negativ, zwei zeigten eine gegenüber dem zugehörigen Tumor deutlich reduzierte Expression (Abb. 26). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich im Peritumorgewebe Tumordinfiltrate befinden, und die schwache Expression des Antigens kann auch von solchen Infiltraten herrühren. Eine Korrelation mit dem HBV Status des Tumors, soweit dieser bekannt war, war nicht möglich, was u.U. aber daran liegt, daß die Proben unterschiedliche Anteile an Bindegewebe enthielten. Zwei weitere PLC-43 positive HCC-Gewebe sowie ein positives zirrhotisches Lebergewebe wurden durch Immunfluoreszenz (E2.5.3) identifiziert, während ein zur Kontrolle gefärbtes normales Lebergewebe negativ war.

Ebenso wurde in einer nach akuter Hepatitis explantierten, zirrhotischen Leber eine schwache Expression des Antigens im Western Blot gefunden.

2.3.1.5 Expression in Murmeltier ("Woodchuck") Hepatomen und Leber

WHV ist bei Murmeltieren, ähnlich wie HBV beim Menschen, mit der Entstehung eines HCCs assoziiert. Um zu überprüfen, ob PLC-43 auch in diesen animalen HCCs exprimiert wird, wurden drei WHV positive Hepatome, Peritumorgewebe zu zweien davon, sowie drei chronisch mit WHV infizierte, aber ansonsten "normale" Lebergewebe untersucht. Zwei der drei im Western Blot untersuchten Tumore zeigten eine starke Expression eines PLC-43 spezifischen Proteins von 43 kD, in einem von zwei Peritumorgeweben wurde eine schwache Expression gefunden, während drei chronisch mit WHV infizierte, aber ansonsten normale Lebergewebe negativ waren (Abb. 27). Diese Konservierung des Antigens im Tierreich läßt darauf schließen, daß es eine generelle Funktion in der Zelle ausübt.

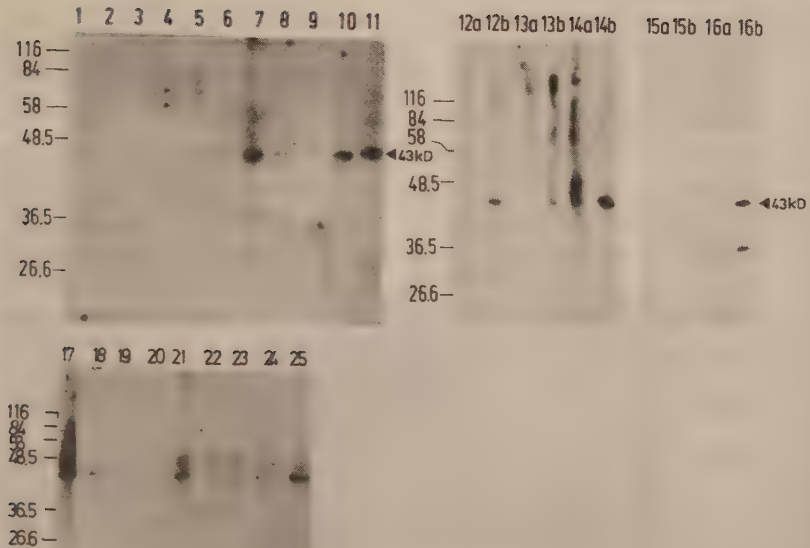


Abb. 26 Western Analyse der Expression von PLC-43 in malignem und normalem Lebergewebe.

Je 20 µg Proteinextrakt (E2.4.1) wurden auf einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt (E2.4.4.2), auf Nitrozellulose transferiert und mit mAk PLC-43 und 125J markierten anti-Maus Immunglobulinen inkubiert (E2.5.1) und autoradiographiert. Aufgetragen wurden:

Spuren			Expression
Spur	1-6:	gesundes Lebergewebe	-
Spur	7:	HCC, HBsAg ⁺	++
Spur	8	HCC, HBsAg ⁻	+
Spur	9	HCC, HBsAg ⁺	+
Spur	10:	HCC, HBsAg ⁻	++
Spur	11:	PLC/PRF/5	++
Spuren	12 - 16:	Peritumor- (a) und Tumorgewebe (b):	
Spuren	12:	HBsAg ⁺ , anti HBc ⁺	a:- b: +
Spuren	13:	HBsAg ⁺ , anti HBc ⁺	a:- b: +
Spuren	14:	HBsAg ⁺ , anti HBc ⁺	a: + b: + +
Spuren	15:	HBsAg ⁻ , anti HBs ⁺ , antiHBc ⁺	a:- b: +
Spuren	16:	Status unbekannt	a:(+) b: + +
Spur	17:	HCC, Status unbekannt	++
Spur	18:	explantierte Leber nach akuter Hepatitis und akutem Leberversagen, zirrhotisch	+
Spur	19:	normale Leber	-
Spur	20:	HCC, HBsAg ⁻ , anti HBs ⁺ , anti HBc ⁺	-
Spur	21:	HCC, HBsAg ⁻ , anti HBc ⁺	+
Spur	22:	HCC, Status unbekannt	-
Spur	23:	HCC, HBsAg ⁻ , anti HBc ⁺	-
Spur	24:	normale Leber	-
Spur	25:	HCC, Status unbekannt	++

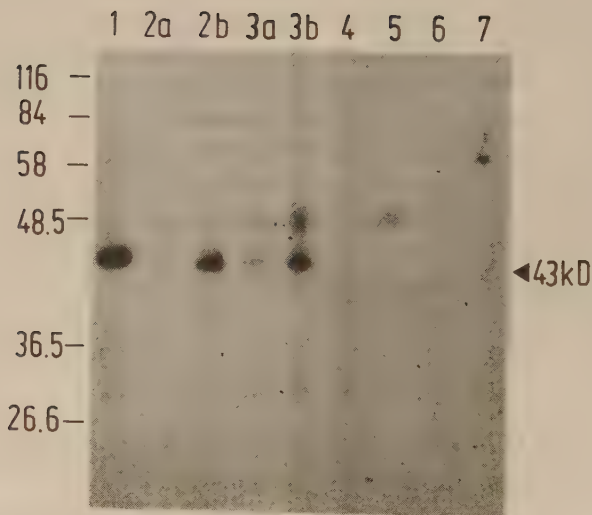


Abb. 27 Western Analyse der Expression von PLC-43 in HCC, Peritumorgewebe und chronisch mit WHV infizierter Leber aus Marmeltieren.

20 µg Proteinextrakt (E2.4.1) wurden auf einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt (E2.4.4.1), auf Nitrozellulose transferiert und mit mAk PLC-43 und ¹²⁵I-markierten anti-Maus Immunglobulinen inkubiert und autoradiographiert. Aufgetragen wurden:

Spur	1:	PLC/PRF/5
Spuren	2 und 3:	Peritumor- (a) und HCC-Gewebe (b)
Spur	4:	HCC
Spuren	5-7:	chronisch mit WHV infizierte, normale Leber.

In der nachfolgenden Tabelle ist die Expression von PLC-43 in Hepatomgewebe und -zelllinien und normalem Lebergewebe zusammengefaßt.

Tabelle IV Expression von PLC-43 in Lebergewebe

	positive	Anzahl getestet	% positiv
humane Leber:			
Hepatomzelllinien	7	7	100
HCC Gewebe	14	17	82
Peritumorgewebe	2(schwach)	5	40
Leberzirrhose	2	2	100
gesunde Leber	1(schwach)	8	12,5
Murmeltierleber:			
HCC Gewebe	2	3	66,6
Peritumorgewebe	1(schwach)	2	50
Leber, chronisch mit WHV infiziert	0	3	0
insgesamt:			
malignes Lebergewebe	23	27	85
gesundes Lebergewebe	1	11	9
Peritumorgewebe und zirrhotische Leber	5(schwach)	9	55

2.3.2 PLC-43 Expression in humanen malignen und normalen Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Expression von PLC-43 spezifisch für Lebertumore ist oder ob auch andere Tumorzellen dieses Antigen exprimieren. Dazu wurden sieben humane Tumorzelllinien im Western Blot überprüft. In sechs dieser Zelllinien konnte die Expression von PLC-43 nachgewiesen werden: HeLa (Cervixkarzinom), MCF7 (Mammakarzinom), TE85 (Osteosarkom), Raji (Burkitt Lymphom), KaH1/3 und Ka1/2 (Kaposisarkom), während die prämyelotische Leukämie-Linie HL60 negativ war (Abb. 28).

Um die Expressionsrate von PLC-43 mit dem Grad der Malignität korrelieren zu können, wurde die semimaligne Kaposisarkomzelllinie KaH1/3 vor und nach Transformation mit Simian Virus 40 (SV40) verglichen. Die transformierte Zelllinie KaH1/3 (SV40) zeigt voll maligne Charakteristika (S. Werner, pers. Mitteilung). In KaH1/3 (SV40) war die Expression von PLC-43 gegenüber KaH1/3 deutlich erhöht (Abb. 28). Dies deutet darauf hin, daß PLC-43 bereits in einem frühen Stadium der malignen Entartung exprimiert wird und die Menge an Antigen in der weiteren malignen Entwicklung ansteigt.

In zwei humanen Fibroblastenlinien (HFF, human foreskin fibroblasts und HEC, human embryonic cells; beide in der 8. Passage) wurde eine schwache Expression von PLC-43 beobachtet. Um zu überprüfen, ob diese Expression mit der Zellteilung assoziiert ist, wurden die Zellen in einer

konfluenten Kultur, in der sie sich nicht mehr signifikant teilten, für eine Woche gezogen. In diesen ruhenden Kulturen war keine Expression des Antigens mehr nachzuweisen (Abb. 28). Als Kontrolle wurde eine konfluente Kultur von PLC/PRF/5 Zellen untersucht. Auch hier war ein Rückgang der Expression von PLC-43 festzustellen, jedoch blieb die Expressionsrate immer noch höher als in allen untersuchten nicht oder nicht voll malignen Zellen. PLC-43 ist also nicht nur mit der malignen Transformation einer Zelle assoziiert, sondern wird auch proliferationsabhängig exprimiert. Allerdings ist die proliferationsabhängige Expression von p43 in normalen Zellen deutlich schwächer als die Expression in malignen Zellen und sie kann in ruhenden nicht malignen Zellen vollständig unterdrückt werden, während in ruhenden malignen Zellen die Expression - wenn auch in vermindertem Umfang - bestehen bleibt.

2.3.3 PLC-43 Expression in peripheren Blutlymphozyten

Der folgende Versuch sollte zeigen, ob eine mitogene Stimulierung sich nicht teilender peripherer Blutlymphozyten (PBL) eine Expression von PLC-43 induzieren kann. Dazu wurden zunächst PBL von zwei Personen untersucht. Sie zeigten keine Expression des Antigens. Die Lymphozyten von Person I wurden in Kultur genommen, mit Phytohämagglutinin (PHA) zur Teilung stimuliert und anschließend mit Interleukin 2 (IL-2) für zwei Monate kultiviert (E2.2.2). Durch die PHA-Behandlung wird auf der T-Zellpopulation der PBL der IL-2 Rezeptor exprimiert und IL-2 wird ins Medium sezerniert, die T-Lymphozyten dedifferenzieren zu T-Lymphoblasten (Mier, 1980). Nach zweimonatiger Kultivierung wurde PLC-43 exprimiert, jedoch lag die Menge an Antigen deutlich unter der in PLC/PRF/5 Zellen (Abb. 29). Für die Expression des Antigens in diesen Zellen sind zwei Erklärungen möglich: Die Expression kann proliferationsabhängig sein wie bei Fibroblastenkulturen, oder sie kann mit der Dedifferenzierung der Zellen zusammenhängen.

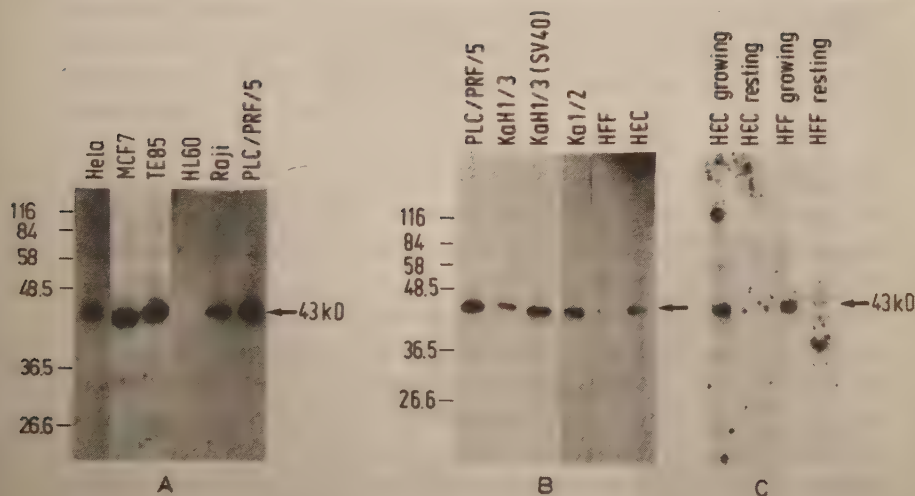


Abb. 28 Western Analyse der Expression von PLC-43 in humanen malignen und nicht malignen Zelllinien.

20 µg Proteinextrakt (E2.4.1) aus den unten aufgeführten Zelllinien wurden auf einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt (E2.4.4.1), auf Nitrozellulose transferiert und mit mAk PLC-43 und 125 J-markierten anti-Maus Immunglobulinen inkubiert und 12 h (A und B) bzw. 7 Tage (c) autoradiographiert. Aufgetragen wurden:

HeLa	Cervixkarzinom
MCF7	Mammakarzinom
TE85	Osteosarkom
HL60	promyelotische Leukämie
Raji	Burkitt Lymphom
KaH1/3	Kaposi Sarkom
KaH1/3(SV40)	KaH1/3, transformiert mit SV40 DNA
Ka1/2	Kaposi Sarkom
HFF	humane Vorhautfibroblasten
HEC	humane embryonale Zellen
"growing"	Die Zellen wurden geerntet, solange sie sich aktiv teilten
"resting"	Die Zellen wurden für 8 Tage in einer konfluenten Kulturschale gehalten.

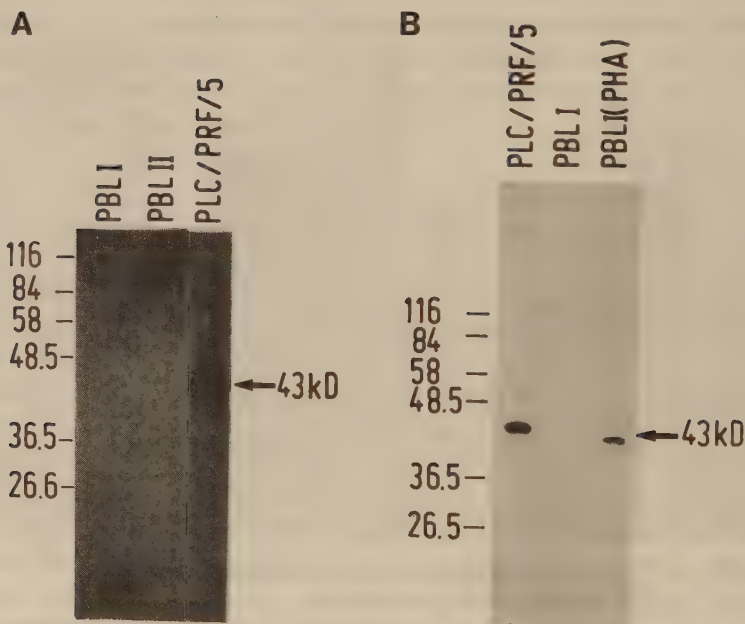


Abb. 29 Western Analyse der Expression von PLC-43 in peripheren Blutlymphozyten im Vergleich zu PLC/PRF/5 Zellen.

20 µg Proteinextrakt (E2.4.1) wurden auf einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt (2.4.4.1), auf Nitrozellulose transferiert und mit mAk PLC-43 und 125 I-J-markierten anti-Maus Immunglobulinen inkubiert und autoradiographiert.

A: PBL I und PBL II: Frisch isolierte Lymphozyten zweier Personen (E2.2.2). Als positive Kontrolle ist ein Proteinextrakt aus PLC/PRF/5 Zellen aufgetragen.

B: Induktion der PLC-43 Expression durch Phytohämagglutinin (PHA) und Kultur mit IL-2. PBL I (PHA): Lymphozyten von Person I wurden für 5 Tage mit PHA stimuliert und anschließend für 8 Wochen mit IL-2 in Kultur gehalten (E2.2.2). Sie teilten sich aktiv. Zum Vergleich wurde ein Proteinextrakt aus PLC/PRF/5 Zellen verwendet.

2.3.4

Expression in Mäuse- und Rattenzelllinien

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die Expression von PLC-43 in Mäuse- und Rattenzelllinien nach deren Transformation induziert werden kann. Hierzu standen drei Systeme zur Verfügung: 1. die Maus-Fibroblastenzelllinie NIH3T3 (ATCC CRL1658) und Transformanten mit den viralen Onkogenen v-fos, v-Ha-ras und v-sis und mit Polyoma Virus, 2. Fisher Rattenzellen, transformiert mit Polyoma Virus oder mit Kaposisarkom DNA sowie 3. die Maus Calvarienzelllinie MC3T3 (Kodama, 1981) vor und nach Infektion mit dem osteogenen Retrovirus OA (MC3T3-OA, Schmidt, 1984).

In den immortalisierten, jedoch nicht malignen NIH3T3 Zellen wird PLC-43 nicht exprimiert, jedoch ist die Expression in allen Transformanten induziert (Abb. 30). In Fisher Rattenzellen ist die Induktion sehr schwach nur nach Transformation mit Kaposisarkom DNA nachweisbar, nicht jedoch nach Transformation mit Polyoma Virus. Möglicherweise liegt hier eine eventuelle Expression unter der Nachweisgrenze. Das Fehlen der Expression von PLC-43 nach der Transformation mit Polyomavirus ist überraschend, da diese Zellen voll maligne sind, wie durch ihr Wachstum als Tumor in der Nacktmaus gezeigt werden konnte (K. Roth, pers. Mitteilung). Andererseits konnte im Western Blot wiederholt keine Expression nachgewiesen werden, so daß man davon ausgehen muß, daß hier, ähnlich wie im Fall der HL60 Zelllinie, PLC-43 negative, aber dennoch maligne Zellen vorliegen. MC3T3 Zellen exprimieren ebenfalls das Antigen erst dann, wenn sie mit dem OA Retrovirus infiziert und dadurch tumorigen geworden sind (Abb. 30). Hier zeigt sich eine eindeutige Korrelation der PLC-43 Expression mit der malignen Entartung der Zelle, die in humanen Zellen so direkt nicht nachgewiesen werden konnte, da humane Zelllinien für entsprechende Transformationsversuche nicht zur Verfügung stehen.

Außerdem wurden drei weitere normale animale Zelllinien (Maus L-Zellen, LTK⁺; Baby Hamster Nierenzellen, BHK; Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, CHO) und die Maus Teratokarzinomzelllinie F9 untersucht. Eine deutliche Expression von PLC-43 war nur in F9 Zellen nachzuweisen, LTK⁺ Zellen zeigten eine schwache und BHK und CHO Zellen keine Expression (Abb. 30). In Tabelle V sind diese Expressionsdaten zusammengefaßt.

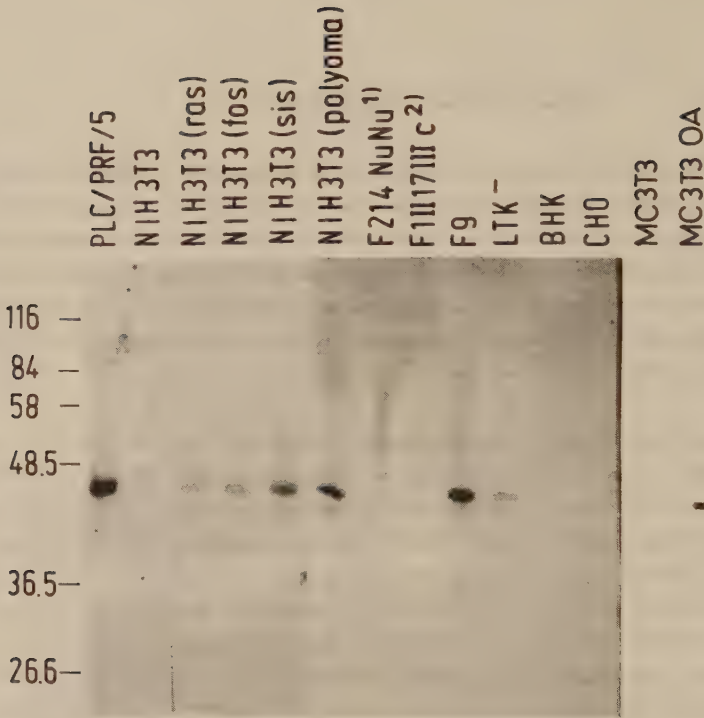


Abb. 30 Western Analyse der Expression von PLC-43 in animalen Zelllinien.

Verglichen sind normale mit in vitro transformierten und malignen Zelllinien.

20 µg Proteinextrakt (E2.4.1) wurden auf einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt (E2.4.4.1), auf Nitrozellulose transferiert und mit mAk PLC-43 und 125 J-markierten anti-Maus Immunglobulinen inkubiert und autoradiographiert.

Das Onkogen bzw. Virus, mit dem die Zellen transformiert wurden, ist über den einzelnen Spuren angegeben. F214 NuNu: Fisher Rat Zellen, transformiert mit Kaposi Sarkom DNA, rekultiviert aus einem Nacktmaustumor; F11117III: Fisher Rat Zellen, transformiert mit Polyoma Virus.

Tabelle V Expression von PLC-43 in Mäuse- und Rattenzellkulturen

	positiv	Anzahl	% positiv
normale Zellen	1	5	20
maligne Zellen	1	1	100
in vitro transformierte Zellen	6	7	85

2.3.5

Zuordnung von PLC-43 zu einer der Klassen tumorspezifischer Antigene

Alle Expressionsdaten sind nochmals in Tabelle VI zusammengefaßt.

Tabelle VI Expression von PLC-43 in Zelllinien und Geweben unterschiedlicher Herkunft

Zell-/Gewebetyp	positiv	Anzahl getestet	% positiv
Leber:			
Hepatomzelllinien	7	7	100
HCC-Gewebe	16	20	80
Peritumorgewebe	3(schwach)	7	42
Leberzirrhose	2	2	100
normale Leber	1(schwach)	11	9
Nicht Leber, human:			
Tumorzelllinien	6	7	85
Fibroblastenkulturen, wachsend	2(schwach)	2	100
Fibroblastenkulturen, ruhend	0	2	0
PBL	0	2	0
PBL (PHA, IL-2)	1	1	100
animale Zelllinien:			
nicht maligne Zellen	1	5	20
maligne oder transformierte Zellen	6	8	75
zusammenfassend:			
malignes Gewebe oder Zellen	40	50	80
normales Gewebe oder Zellen	1	32	12
(ohne Peritumorgewebe)	+ 3(schwach)		

Aus den Expressionsdaten geht hervor, daß PLC/PRF/5 ein tumorspezifisches Antigen ist, da es in 80 % aller untersuchten malignen Zellen exprimiert wird. Nur in 12 % der untersuchten normalen Zellen wurde eine schwache Expression gefunden. Demnach ist das Antigen in die Klasse III einzuordnen, d.h. es gehört zu den Proteinen, die in Tumoren stark überexprimiert sind, jedoch in einigen normalen Geweben eine schwache Expression zeigen. Sollte die hier festgestellte Expression in normalen Zellen allerdings darauf zurückzuführen sein, daß sich die humanen Fibroblasten und die LTK⁻ in Kultur befinden und dadurch gegenüber den primären Zellen verändert sind, und daß bei der normalen Leber, die eine schwache Expression zeigte, eine Lebererkrankung vorlag, über die keine Informationen erhalten wurden, so könnte es sich auch um ein Antigen der Klasse II handeln.

2.4

Lokalisation von PLC-43 in der Zelle

Um PLC-43 in der Zelle und in Gewebeschnitten zu lokalisieren, wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt (E2.5.3). Dazu wurden PLC/PRF/5 Zellen, humane Fibroblasten, HepG2 Zellen und Gewebeschnitte aus HCC, normaler und zirrhotischer Leber auf Objektträgern fixiert und mit mAk PLC-43 sowie einem zweiten, mit FITC markierten Antikörper behandelt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert. In Übereinstimmung mit den Daten aus den Western Blots wurde eine positive Reaktion mit PLC/PRF/5 und HepG2 Zellen, 2 HCC's und einer kleinknotigen Leberzirrhose gefunden. Die Fluoreszenz mit den beiden menschlichen Fibroblastenlinien (HFF und HEC) war schwach, NIH3T3 Zellen und Gewebe aus drei normalen Lebern waren negativ. In allen untersuchten Fällen war die Fluoreszenz nur im Cytoplasma zu finden, d.h. PLC/PRF/5 ist ein cytoplasmatisches Antigen. Abb. 31 zeigt als Beispiel die Immunfluoreszenz an 6 Präparaten (PLC/PRF/5, HFF, 2 HCC's, der Zirrhose und der gesunden Leber).

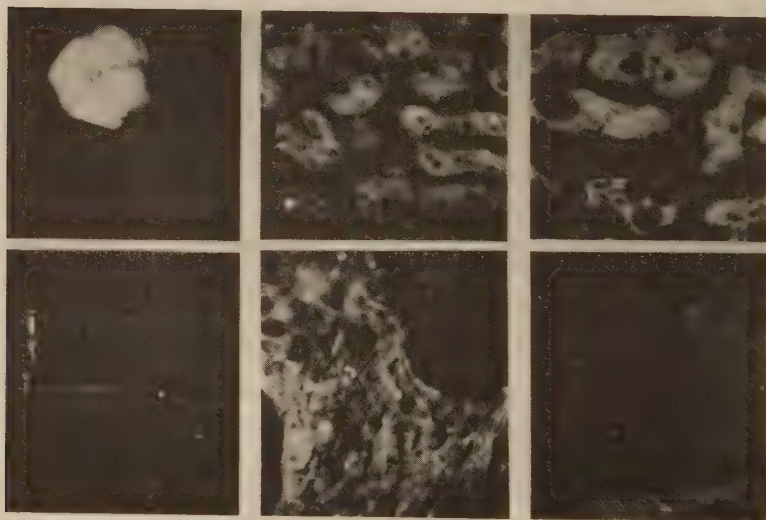


Abb. 31 Intrazelluläre Lokalisation von PLC-43

Die Zellen bzw. Gewebe wurden auf Objektträgern mit mAk PLC-43 und FITC markierten anti-Maus Immunglobulinen inkubiert (E2.5.3) und in einem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert.

Obere Reihe: links: PLC/PRF/5, Mitte: HCC, rechts: HCC. Untere Reihe: links: HFF, Mitte: kleinknotige Leberzirrhose, rechts: normale Leber.

2.5 Biochemische Charakterisierung von PLC-43

2.5.1 Untersuchung der Glykosylierung

Um zu überprüfen, ob PLC-43 glykosyliert ist und mAk PLC-43 möglicherweise ein Glykoepitop erkennt, wurde versucht, das Antigen zu deglykosylieren. Dazu wurde ein Proteingesamtzell-extrakt der PLC/PRF/5 Zelllinie (20 µg) über Nacht mit Endoglykosidase F behandelt. Dieses Enzym spaltet die meisten Glykanreste von Proteinen ab. Falls mAk PLC-43 ein Glykoepitop erkennt, reagiert der Antikörper nach Deglykosylierung nicht mehr mit dem Antigen. Falls ein Aminosäureepitop eines glykosylierten Proteins erkannt wird, wäre im Western Blot eine Bande niedrigeren Molekulargewichtes festzustellen. Da der Antikörper auch nach Deglykosylierung des PLC/PRF/5 Proteinextraktes noch eine Bande von 43 kD erkennt (Abb. 32), kann man davon ausgehen, daß das Protein nicht glykosyliert ist. Diese Tatsache steht in Einklang mit der cytoplasmatischen Lokalisation von PLC-43.

2.5.2 Untersuchung der Phosphorylierung

Da viele cytoplasmatische Tumorantigene und Onkogene Phosphokinasen sind und häufig selbst in einer phosphorylierten Form vorliegen, wurde diese Möglichkeit für PLC-43 überprüft. Dazu wurde das Antigen mit Hilfe von mAk PLC-43 und Protein A Sepharose aus dem Cytoplasma von in vivo mit ^{32}P markierten PLC/PRF/5 Zellen (E2.2.2) isoliert (E2.6.2.2) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (E2.4.4). Der cytoplasmatische Proteinextrakt hatte eine spezifische Radioaktivität von 130 000 cpm/µg Protein. p43 konnte durch Silberfärbung des Gels nachgewiesen werden. Wenn p43 phosphoryliert vorliegen müßte, muß sich diese Bande auch durch Autoradiographie nachweisen lassen. Auf dem Autoradiogramm des Geles war jedoch keine spezifische Bande von 43 kD zu erkennen, p43 ist somit nicht phosphoryliert.

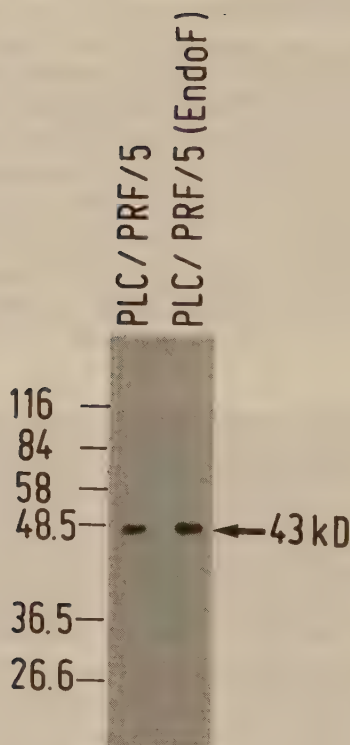


Abb. 32 Western Analyse von PLC-43 vor und nach Endoglykosidase F Verdau

20 ug Gesamtzellextrakt aus PLC/PRF/5 Zellen wurden über Nacht bei 37 °C mit 20 U Endoglykosidase F inkubiert und vergleichend mit dem unbehandelten Extrakt im Western Blot untersucht (E2.5.1). Es ergibt sich kein Hinweis auf eine Glykosylierung, da sich nach Behandlung das Molekulargewicht von PLC-43 nicht ändert.

3. IMMUNOSCREENING DER LAMBDA GT11 cDNA BANK MIT mAk PLC-43

Die Identifizierung einer PLC-43 spezifischen cDNA war das nächste Ziel dieser Arbeit, um dann mit Hilfe der cDNA die Funktion von PLC-43 molekularbiologisch untersuchen zu können. Dazu wurden 1×10^6 Phagen (entsprechend $5,5 \times 10^5$ rekombinanten Phagen) der in 1.2.2 beschriebenen cDNA Bank ausplattiert und die Expression der klonierten Sequenzen wurde durch Auflegen eines IPTG-getränkten NC-Filters bei 37°C induziert. Dieses Filter wurde mit mAk PLC-43 und einem zweiten, gegen Maus Immunglobuline gerichteten Antikörper behandelt (E2.18.2), der mit Peroxidase oder mit ^{125}J markiert war. Weder mit dem Peroxidase gekoppelten noch mit dem ^{125}J -markierten zweiten Antikörper, der eine wesentliche Sensitivitätssteigerung bietet, und verlängerter Exposition der Röntgenfilme konnte ein positiver Klon identifiziert werden.

Da der entsprechende cDNA Klon u.U. bei der Amplifizierung der cDNA Bank verlorengegangen ist oder möglicherweise die Zahl von $5,5 \times 10^5$ rekombinanten Phagen nicht ausreichend war, um eine seltene mRNA zu finden, wurde eine neue cDNA Bank der PLC/PRF/5 Zelllinie erstellt. Sie enthielt insgesamt $1,2 \times 10^6$ Phagen, davon etwa $8,5 \times 10^5$ rekombinante. Sie wurde ohne Amplifizierung verwendet, um zu vermeiden, daß bestimmte Sequenzen unterrepräsentiert sind. Auch in dieser Bank konnte kein PLC-43 spezifischer cDNA Klon identifiziert werden.

Für dieses negative Ergebnis gibt es mehrere Erklärungen:

1. Die mit einem monoklonalen Antikörper erreichte Sensitivität könnte nicht ausreichen, um die entsprechende cDNA zu identifizieren. Während viele Antikörper aus einem Serum an verschiedene Epitope einer exprimierten cDNA binden und damit ein entsprechend stärkeres Signal hervorrufen, kann bei einem mAk immer nur ein Antikörpermolekül an ein Proteinmolekül binden, da nur ein bestimmtes Epitop erkannt wird.
2. Das Antigen liegt in der exprimierten cDNA Bank als Fusionsprotein mit der beta-Galaktosidase vor. Auch wenn es im richtigen Leserahmen exprimiert wird, weist es möglicherweise eine andere Tertiärstruktur auf und wird von dem mAk nicht erkannt, da das Epitop verändert ist. Mit einem polyklonalen Antiserum hingegen wäre eine Reaktion wahrscheinlich möglich, da nicht alle Epitope verändert sind.
3. Die gesuchte cDNA ist entweder nicht im richtigen Leserahmen oder überhaupt nicht in der cDNA Bank vertreten, was unwahrscheinlich ist bei $1,4 \times 10^6$ untersuchten rekombinanten Phagen, oder das erkannte Epitop ist nicht kloniert, weil es sich nahe dem Amino- oder Carboxyterminus des Proteins befindet und die cDNA nicht die gesamte Sequenz der mRNA umfaßt.

Um einen PLC-43 spezifischen cDNA Klon zu identifizieren, ist es daher nötig, diese Methode zu verbessern bzw. andere Methoden anzuwenden. Eine Erhöhung der Sensitivität im "Immunoscreening" kann durch die Herstellung eines spezifischen polyklonalen Antiserums erreicht werden. Die Probleme eines "Immunoscreening" können ganz umgangen werden, wenn es gelingt, PLC-43 spezifische Oligonukleotide zu synthetisieren. Beides setzt die Isolierung des Antigens voraus.

4. ISOLIERUNG VON PLC-43

Mit dem entwickelten spezifischen monoklonalen Antikörper ist es möglich, ein PLC-43 durch Immunoaffinitätschromatographie aus einer Mischung von Proteinen zu isolieren. Da PLC-43 im Cytoplasma der Zelle lokalisiert ist (2.4), wurde für die Isolierung ein cytoplasmatischer Proteinextrakt aus PLC/PRF/5 Zellen (E2.4.2) als Ausgangsmaterial für die Reinigung verwendet.

Um eine spezifische Affinitätschromatographiesäule herzustellen, wurde versucht, mAk PLC-43 an CNBr aktivierte Sepharose zu koppeln (E2.6.1), jedoch verlor der Antikörper hierdurch seine Reaktivität gegenüber PLC-43, was sich darin äußerte, daß PLC-43 nicht an das Säulenmaterial gebunden werden konnte. Daher wurde mAk PLC-43 an Protein A Sepharose CL4B absorbiert. Protein A ist ein Protein aus *Staphylococcus aureus*, welches Immunglobuline nicht kovalent zu binden vermag. Hierbei wird der Antikörper nicht chemisch verändert und behält seine Reaktivität gegenüber dem Antigen. Cytoplasmatischer Proteinextrakt aus PLC/PRF/5 Zellen wurde an die mit mAk PLC-43 beladene Protein A Sepharose gebunden (E2.6.2.1). Nach dem Waschen der Säule zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde PLC-43 zusammen mit dem Antikörper durch 10 mM Natriumcitrat-Puffer pH 4 eluiert. Das Eluat wurde auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (E2.4.4) und die Proteine wurden mit Coomassie Blue angefärbt (E2.4.4.1). Auf dem Gel war eine ca. 48 kD große Bande zu erkennen, welche dem Antikörper entspricht, sowie eine 43 kD große Bande, die PLC-43 entspricht. Es wurde nun versucht, diese Bande in einem Western Blot mit mAk PLC-43 nachzuweisen (E2.5.1), um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um PLC-43 handelt. Im Western Blot konnte jedoch keine 43 kD große Bande nachgewiesen werden.

Es erschien sehr unwahrscheinlich, daß ein Protein, welches mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers isoliert worden war, nicht das gesuchte Antigen sein sollte, und es lag nahe, daß durch die Isolierungsprozedur die Tertiärstruktur des Antigens so verändert worden war, daß eine Reaktion mit mAk PLC-43 nicht mehr möglich war. Dies ist möglicherweise auf eine Denaturierung des Epitops bei pH 4 zurückzuführen.

Um dies zu überprüfen, wurden 20 µg Proteinextrakt aus PLC/PRF/5 Zellen für 10 Minuten mit dem Citratpuffer pH4 angesäuert. Eine gleichbehandelte Probe wurde anschließend für 24 h gegen 10 mM TrisHCl pH 7,5 dialysiert, um dem Protein die Möglichkeit zu geben, langsam zu renaturieren. Diese beiden Proben wurden zum Vergleich mit 20 µg unbehandeltem Extrakt auf einem Western Blot untersucht. Es zeigte sich, daß eine Erkennung des Antigens nur im unbehandelten Extrakt möglich war (Abb. 33), das erkannte Epitop bei pH 4 also denaturiert wurde und auch durch Dialyse nicht renaturiert werden konnte.

Vor der weiteren Verwendung war es jedoch notwendig, das Antigen zumindest qualitativ im Western Blot nachzuweisen, um sicher zu gehen, daß das richtige Protein isoliert wurde. Um dies zu erreichen, wurde die Proteinisolierung in einem kleinen Ansatz im "batch" Verfahren durchgeführt (E2.6.2.3). Das Säulenmaterial wurde hierzu nicht in eine Chromatographiesäule gefüllt, sondern die einzelnen Schritte wurden im Reagenzglas ausgeführt. Da eine Umfaltung der Tertiärstruktur bei pH 4 möglicherweise nicht spontan vonstatten geht, wurde nur für 30 Sekunden mit 10 mM Natrium-Citrat pH 4 eluiert und das Eluat sofort anschließend mit 2 M Tris (pH 11,5) neutralisiert. Auf diese Weise war es möglich, das Antigen nicht nur mit Coomassie Blue anzufärben, sondern auch als relativ schwache Bande im Western Blot nachzuweisen (Abb. 33). Die Intensität der Bande im Western Blot entspricht in keiner Weise der Menge des insgesamt isolierten Antigens, sondern offenbar nur einem relativ geringen, nicht denaturierten Anteil. Für eine Sequenzierung ist es jedoch unerheblich, ob das Protein im nativen oder im denaturierten Zustand vorliegt.

4.1 Isolierung von PLC-43 zum Sequenzieren

Um ein Protein ausgehend vom N-Terminus sequenzieren zu können, sollten mindestens 100 pMol vorliegen (Lottspeich, pers. Mitteilung), bei einem Protein von 43 kD entspricht das 4,3 µg. Um diese Menge an Antigen isolieren zu können, wurde cytoplasmatischer Proteinextrakt aus 70 T175 Flaschen von PLC/PRF/5 hergestellt (170 mg Protein). Daraus wurde im "batch" Verfahren das Protein isoliert. Da die Probe nach der Affinitätschromatographie auf einem präparativen Gel aufgetrennt werden sollte, war es nötig, sie salzfrei zu erhalten. Die durch die Elution mit Natriumcitrat und anschließender Neutralisation mit Tris entstehende hohe Salzkonzentration würde ein verändertes Laufverhalten auf dem Gel bewirken. PLC-43 wurde daher mit 0,1 %iger Trifluoressigsäure (TFA) eluiert (Lottspeich, pers. Mitteilung). Gegenüber dem Citratpuffer hat TFA den Vorteil, daß es in der Vakuumzentrifuge mit dem Wasser eingedampft werden kann. Ein Aliquot des Eluats wurde auf einem Polyacrylamidgel überprüft. Es zeigte sich, daß mit Ausnahme des ebenfalls eluierten Antikörpers keine nachweisbaren Mengen an Fremdproteinen in der Präparation vorlagen. Die Menge an isoliertem Antigen kann aus der Intensität der Bande im

gefärbten Gel nur abgeschätzt werden, da sie für eine Proteinbestimmung zu gering ist. Sie lag bei etwa 4 ug aus 170 mg cytoplasmatischen Proteinen.

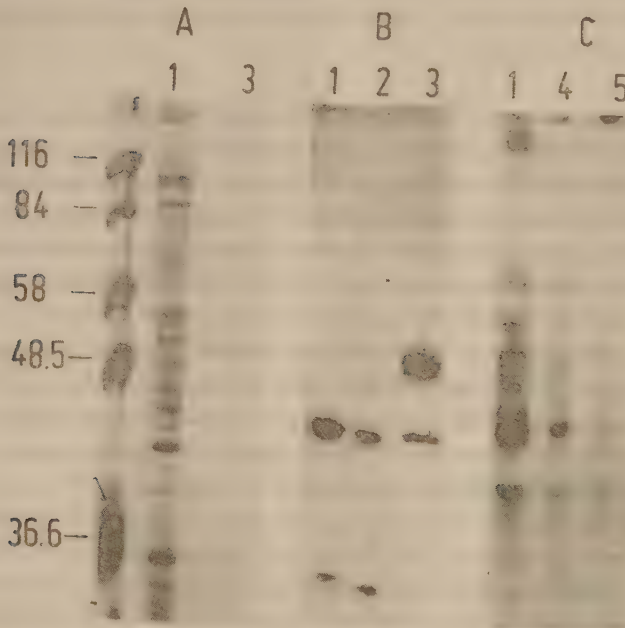


Abb. 33 Aufreinigung von PLC-43

PLC-43 wurde aus 300 ug cytoplasmatischem Proteinextrakt aus PLC/PRF/5 Zellen (E2.4.2) immunoaffinitätschromatographisch gereinigt (E2.6.2.2). Jeweils die Hälfte des Eluats wurde auf einem mit Coomassie Blue gefärbten Polyacrylamidgel (E2.4.4) und im Western Blot (E2.5.1) untersucht.

A: Mit Coomassie Blue gefärbtes Acrylamidgel. Spur 1: cytoplasmatischer Proteinextrakt vor der Aufarbeitung. Spur 3: PLC-43 Eluat.

B: Western Analyse des cytoplasmatischen Proteinextraktes und des gereinigten Proteins. Spur 1: cytoplasmatischer Proteinextrakt vor der Aufarbeitung (20 ug). Spur 2: Cytoplasmatischer Proteinextrakt nach Extraktion von PLC-43 (entspricht dem Säulendurchlauf, 100 ug). Spur 3: PLC-43 Eluat.

C: Nachweis der Denaturierung des von PLC-43 erkannten Epitopes bei pH4. Spur 1: unbehandelter cytoplasmatischer Proteinextrakt (20 ug). Spur 4: 20 ug cytoplasmatischer Proteinextrakt nach Säurebehandlung bei pH 4. Spur 5: 20 ug cytoplasmatischer Proteinextrakt, denaturiert bei pH4 und über Nacht dialysiert gegen 20 mM TrisHCl pH 8.

4.2 Sequenzierung

Vor der Sequenzierung wurde das Protein auf einem 10 %igen Acrylamidgel aufgetrennt, auf eine Glasfasermembran gebliotet und dort angefärbt. Die PLC-43 spezifische Bande wurde nun ausgeschnitten und zur Sequenzierung eingesetzt. Eine direkt Sequenzierung des N-Terminus war jedoch nicht möglich, da, wie sich herausstellte, die N-terminale Aminosäure chemisch blockiert ist (Lottspeich, pers. Mitteilung).

Um Oligonukleotide zum Screenen einer cDNA Bank konstruieren zu können, ist es jedoch nicht notwendig, daß die zugrunde gelegte Peptidsequenz vom N-Terminus des Proteins stammt; im Gegenteil kann die Verwendung einer internen Sequenz sogar vorteilhaft sein, da das dem N-Terminus des Proteins entsprechende 5' terminale Ende der cDNA in der cDNA möglicherweise nicht kloniert ist. Daher, und um die Schwierigkeiten, welche mit der N-terminalen Blockierung von PLC-43 verbunden sind, zu umgehen, wurde eine tryptische Spaltung des Antigens vorgenommen, um dann einzelne Peptide zu isolieren und von ihrem N-Terminus ausgehend sequenzieren zu können. Zu diesem Zweck wurde erneut PLC-43 aus 70 T175 Flaschen PLC/PRF/5 Zellen hergestellt und auf einem präparativen, 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Blue angefärbt (s. Abb. 34a) und die PLC-43 spezifische Bande ausgeschnitten. Das Protein wurde im Gel mit Trypsin gespalten, die Peptide wurden eluiert und durch "reversed phase" Chromatographie (HPLC) aufgetrennt (Abb. 34b). Drei Peptide wurden ausgewählt und im Gasphasensequenzator (Applied Biosystems, 470M) vom Aminoterminus her sequenziert.

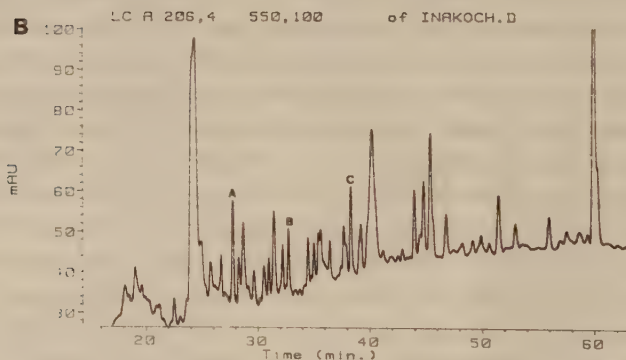
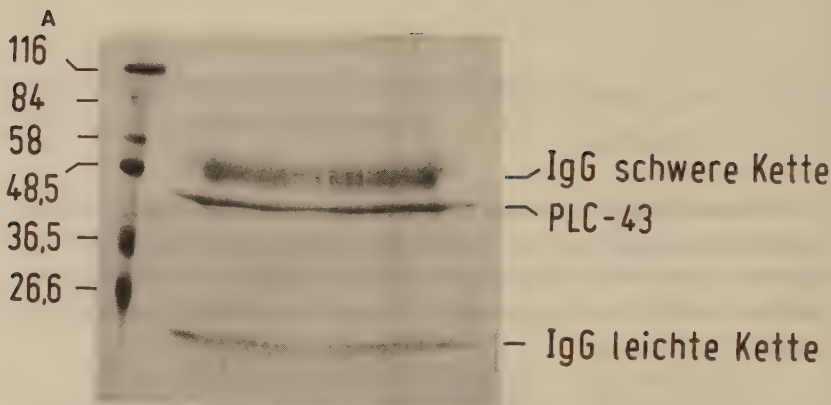


Abb. 34

A**Präparative Isolierung von PLC-43**

PLC-43 wurde aus 170 mg cytoplasmatischem Proteinextrakt aus PLC/PRF/5 Zellen isoliert (E2.6.2.2), wobei die Elution mit 0,1 % TFA erfolgte. Das gesamte Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge eingedunstet und auf einem präparativen 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt. Hierdurch wurde PLC-43 von der schweren und leichten Kette des monoklonalen Antikörpers getrennt. Die PLC-43 spezifische Bande wurde ausgeschnitten.

B**Auftrennung der tryptischen Peptide über "reversed phase" HPLC**

Zur tryptischen Spaltung wurde das Gelstück mit der PLC-43 spezifischen Bande für 5 h bei 37 °C in 100 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5, 0,5 mM CaCl_2 und 2 μg Trypsin inkubiert. Die Spaltprodukte wurden aus der Polyacrylamidmatrix mit 75 % TFA in H_2O eluiert und anschließend durch "reversed phase" HPLC (Säule: Vydac, Science Service) aufgetrennt. Als Elutionssystem wurde ein Gradient von 0 - 60 % Acetonitril mit 0,1 % TFA verwendet. Die drei für die Sequenzierung ausgewählten Peptide sind mit A, B und C markiert.

Von Peptid A wurde eine Sequenz von 9 Aminosäuren erhalten. Es ergab sich eine unterschiedlich starke Homologie zu den Proteinen der Familie der Translations-Elongationsfaktoren EF-Tu (in Prokaryoten) bzw. EF1-alpha (in Eukaryoten; Abb. 35a). Sie beträgt im Einzelnen:

EF-Tu (<i>E. coli</i>)	88 % (An, 1980)
EF-Tu (<i>Euglena gracilis</i> Chloroplasten)	66 % (Montandon, 1983)
EF-Tu (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mitochondrien)	77 % (Nagata, 1983)
EF1-alpha (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cytoplasma)	44 % (Nagashima, 1986)
EF1-alpha (<i>Drosophila melanogaster</i>)	33 % (Hovemann, 1988)
EF1-alpha (<i>Artemia salina</i>)	33 % (Hemert, 1984)

Aufgrund der hohen Homologien läßt sich eindeutig schließen, daß es sich bei PLC-43 um ein Protein aus der Familie der translationellen Elongationsfaktoren Tu bzw. Alpha handelt. Die höhere Homologie zu den prokaryotischen Faktoren bei diesem Peptid ist nicht unbedingt aussagekräftig, da bei der Kürze des Peptids bereits kleine Sequenzunterschiede große Homologieunterschiede bewirken. Wie aus Abb. 35a ersichtlich ist, wären die Homologieraten sehr viel ähnlicher, läge das Peptid etwa 10 Aminosäuren weiter Richtung C-Terminus.

Auch Peptid B erwies sich als homolog zu den Proteinen der EF-Tu- bzw. EF1-Familie. Hier konnten 32 Aminosäuren sequenziert werden, so daß die Homologieraten größere Signifikanz haben dürften. Der Sequenzvergleich ist in Abb. 35b dargestellt. Die Homologien sind hier etwa gleich hoch zu den prokaryotischen wie den eukaryotischen Faktoren und betragen im Einzelnen:

EF-Tu (<i>E. coli</i>)	50 %
EF-Tu (<i>Euglena gracilis</i> Chloroplasten)	50 %
EF-Tu (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mitochondrien)	59 %
EF1-alpha (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cytoplasma)	47 %
EF1-alpha (<i>Drosophila melanogaster</i>)	47 %
EF1-alpha (<i>Artemia salina</i>)	50 %

Von Peptid C wurde die Sequenz von 10 Aminosäuren erhalten. Sie zeigte folgende Homologie zu den Elongationsfaktoren (s.a. Abb. 35c):

EF-Tu (<i>E. coli</i>)	60 %
EF-Tu (<i>Euglena gracilis</i> Chloroplasten)	60 %
EF-Tu (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mitochondrien)	50 %

In den eukaryotischen Faktoren wurde ein entsprechender Sequenzabschnitt nicht gefunden.

A			% Homologie
Peptid		DKPHVNVGT	
1.	7	ERTKPHVNVGTIGHVDHGKT	88
2.	7	ERTKPHINIGTIGHVDHGKT	66
3.	43	DRSKPHVNIGTIGHVDHGKT	77
4.	2	GKEKSHINVVIGHVDSGKS	44
5.	2	GKEKHTNIVVIGHVDSGKS	33
6.	2	GKEKHTNIVVIGHVDSGKS	33
B			
Peptid		LLDAVDTYIPV PARSLEKPFL-LPVEAVYSVPG	
1.	192	LAGFLDSYIPEPERAIDKPFL-LPIEDVFSISG	50
2.	202	LMDQVDSYIPTPTRDTEKDFL-MAIEDVLSITG	50
3.	230	LLDAVDEYIPTPERDLNKPFL-MPVEDFFSISG	59
4.	226	LLEAID-AIEQPSRPTDKP-LRLPLQDVYKIGG	47
5.	228	LVDALD-AILPPARPTDKA-LRLPLQDVYKIGG	47
6.	228	LLDALD-AILPPSRPTEKR-LRLPLQDVYKIGG	50
C			
Peptid		?ETQVYILSK	
1.	305	FESEVYILSK	70
2.	315	FDSQVYILTK	60
3.	245	ILASLYILSK	50

Abb. 35 Sequenzvergleich von PLC-43 mit verschiedenen Translationselongationsfaktoren
 Die Peptide A, B und C wurden mit den entsprechenden Bereichen der Elongationsfaktoren EF-Tu aus *E. coli* (1.), EF-Tu aus *Euglena gracilis* Chloroplasten (2.), EF-Tu aus *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrien (3.), EF1-alpha aus *Saccharomyces cerevisiae* Cytoplasma (4.), EF1-alpha (*Drosophila melanogaster*, 5.) und EF1-alpha (*Artemia salina*, 6.) verglichen. Die Positionen der Homologien in den einzelnen Proteinen sowie die Homologieraten sind angegeben. Identische Aminosäuren sind kursiv gedruckt.

PLC-43 ist damit identifiziert als ein Elongationsfaktor der Translation. EF-Tu bzw. EF1 sind an der Bindung der Aminoacyl-t-RNAs an das Ribosom mit der naszierenden Proteinkette beteiligt (Moldave, 1985, Übersichtsartikel). Diese Faktoren gehören einer Familie von gleichartigen Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichtes an und sind in jeder normalen Zelle vorhanden, da ohne sie eine Proteinbiosynthese nicht möglich ist. Das Molekulargewicht von EF-Tu und EF1-alpha

beträgt 43 bzw. 53 kD. Sie besitzen ein acetyliertes Aminoende (daher konnte der Aminoterminus nicht direkt sequenziert werden) und zwei funktionelle Domänen für die Bindung der Amino-Acyl-tRNA (Cys Pos. 57 bei EF-Tu von E.coli) und für die Bindung von GTP (Cys bei Pos. 138 bei EF-Tu von E.coli). Mit den sequenzierten Bereichen werden diese funktionellen Domänen nicht abgedeckt. Die Proteine dieser Familie sind jedoch in allen Bereichen sehr stark konserviert, so daß angenommen werden kann, daß die Sequenzhomologie sich auch über die funktionellen Domänen erstreckt und damit die Funktion in PLC-43 konserviert ist.

Die etwas höhere Homologie zu den prokaryotischen und mitochondrialen Elongationsfaktoren EF-Tu sowie das Molekulargewicht von 43 kD könnte zunächst darauf hindeuten, daß hier ein prokaryotisches oder mitochondriales Protein identifiziert wurde. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da das Protein in großer Menge in postmitochondrialen cytoplasmatischen Überständen nachgewiesen werden konnte und auch daraus isoliert wurde. Desweiteren wurde beschrieben, daß zwischen den pro- und eukaryotischen Elongationsfaktoren keine immunologische Kreuzreaktivität besteht (Coppard, 1982).

PLC-43 ist damit wahrscheinlich ein weiterer Faktor dieser Klasse von Translations-Elongationsfaktoren, der in gesunden Zellen nicht exprimiert wird, sondern erst im Zuge der malignen Entartung oder nach mitogener Stimulierung der Zellen exprimiert wird und dann regulatorische Funktionen bei der Elongation der Translation übernimmt. Aus den geschilderten Versuchen kann jedoch nicht eindeutig geschlossen werden, ob es sich tatsächlich um die Expression eines neuen Proteins handelt, oder ob ein physiologischerweise vorhandenes Protein anders modifiziert wird, so daß erst dadurch eine Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper möglich ist. Die Tatsache jedoch, daß die eukaryotischen Elongationsfaktoren ein Molekulargewicht von 53 kD und PLC-43 von 43 kD aufweisen, spricht eher für die Transkription und Translation eines tumorspezifischen Gens. Weitere Versuche müssen nun zeigen, wie sich PLC-43 in seiner Funktion von den übrigen Elongationsfaktoren unterscheidet und damit zur malignen Entartung beitragen kann.

5. Zwischenzusammenfassung

Mit dem hergestellten monoklonalen Antikörper mAk PLC-43 wurde ein tumorspezifisches Antigen (PLC-43) identifiziert, welches wie folgt charakterisiert wurde:

1. PLC-43 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 43 kD. Es ist im Cytoplasma lokalisiert und weder glykosyliert noch phosphoryliert.
2. PLC-43 wird stark in 80 % der untersuchten malignen Gewebe und Zelllinien exprimiert, jedoch nur schwach in 12 % der nicht malignen Gewebe und Zellen. Es handelt sich damit um ein tumorspezifisches Antigen der Klasse III.
3. Der Vergleich HBV positiver und negativer Hepatomzelllinien deutet darauf hin, daß die Expressionsrate von PLC-43 möglicherweise durch eine HBV-spezifische Transaktivierung erhöht sein kann.
4. In animalen Zellen konnte die Expression von PLC/PRF5-68 durch Vergleich vor und nach in vitro Transformation direkt mit der malignen Entartung korreliert werden.
5. Die Expressionsrate korreliert mit unterschiedlichen Stadien der Malignität; die Expression ist am stärksten in voll malignen Zellen und sinkt, wenn maligne Zellen zur Differenzierung angeregt werden.
6. In normalen Zellen kann die Expression durch mitogene Einflüsse induziert werden.
7. PLC-43 kann mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers isoliert werden.
8. Die Sequenzierung dreier tryptischer Peptide ergab eine 50 - 60 %ige Homologie zu den pro- und eukaryotischen Elongationsfaktoren der Translation EF-Tu bzw. EF1-alpha, so daß davon ausgegangen werden kann, daß PLC-43 in diese Proteinfamilie gehört und möglicherweise eine entsprechende Funktion in der Zelle ausübt.

D

DISKUSSION

Die epidemiologische Korrelation einer HBV Infektion mit dem Auftreten eines Primären Leberzellkarzinoms (Szmunn, 1978), die häufige Inzidenz eines HCC in Tieren nach Infektion mit animalen Hepadna Viren sowie die Integration viraler Sequenzen in 90 % der humanen HCCs und die Expression integrierter viraler Gene implizieren eine kausale Rolle des HBV bei der Tumorentstehung. Der Mechanismus einer HBV assoziierten Onkogenese muß weiterhin als ungeklärt betrachtet werden. Die chromosomalen HBV Integrate wurden detailliert untersucht (Nagaya, 1987), jedoch konnten diese Untersuchungen keine allgemeine Rolle der Integrate in der Onkogenese aufzeigen. Die Integrate weisen mehr oder weniger große Unterschiede in ihrem Integrationsort sowie in der Struktur der viralen Gene auf, so daß eine direkte, HBV induzierte Karzinogenese unwahrscheinlich ist. Es wurde jedoch gezeigt, daß von den Expressionsprodukten verschiedener Integrate ein "transaktivierender" Einfluß auf virale und eukaryotische Promotoren ausgehen kann. Die transaktivierenden Sequenzen sind in vielen Fällen in der X-Region lokalisiert (Wollersheim, 1987; Wollersheim, 1988; Zahm, 1988), können aber möglicherweise auch in der PreS Region lokalisiert sein (Duelli, 1988; Meyer, 1988). Ob die Transaktivierung zellulärer Gene durch ein HBV Genprodukt bei der HBV assoziierten Hepatokarzinogenese eine Rolle spielt, bleibt zu zeigen. Sollte dies der Fall sein, so muß man davon ausgehen, daß in Hepatomzellen bestimmte Proteine stark exprimiert werden, die in gesunden Leberzellen nicht oder in geringerem Maße exprimiert werden.

Man kennt eine Anzahl solcher tumorspezifisch exprimierter Proteine in Hepatomzellen (Carlson, 1985; Shouval, 1985; Hu, 1986; Wiedmann, 1987; Wilson, 1988). Wie und in welchem Stadium der Onkogenese diese Gene aktiviert werden und ob HBV dabei möglicherweise eine Rolle spielt, ist jedoch nicht bekannt. Die meisten der bisher identifizierten, tumorspezifischen Proteine sind auf der Zelloberfläche lokalisiert. Deshalb wird angenommen, daß sie eine Funktion in der Zell-Zell-Kommunikation oder in der Übermittlung regulatorischer Informationen haben. Bisher konnte keinem dieser Proteine eine eindeutige Funktion zugeschrieben werden.

Um einen Beitrag zum Verständnis der HBV assoziierten Hepatokarzinogenese und der Deregulation der zellulären Genexpression zu leisten, wurden in der vorliegenden Arbeit zum einen Transkripte von integrierten HBV Sequenzen charakterisiert, zum anderen wurde ein tumorspezifisches Protein, dessen Expression möglicherweise durch eine HBV Genprodukt gesteigert werden kann, identifiziert und untersucht.

1. **EXPRESSION EINER HYBRID-HBV mRNA MIT MITOCHONDRIAL-ÄHNLICHEN SEQUENZEN**

HBs und HBx spezifische mRNAs werden in den meisten HBV positiven Hepatomen und daraus entwickelten Zelllinien exprimiert. Geht man davon aus, daß ein HBV Genprodukt die Expression zellulärer Gene möglicherweise in "trans" stimuliert, so ist die Expression der entsprechenden viralen Gene für die Transformation nötig. Die Untersuchung der HBVspezifischen Transkripte bietet daher eine Möglichkeit, etwas über den Mechanismus der HBV assoziierten Karzinogenese zu lernen.

Um Aussagen über die Struktur und Funktion von HBV Transkripten in der Zelle machen zu können, wurden HBV spezifische mRNAs aus der PLC/PRF/5 Zelllinie kloniert. Von den sechs ursprünglich isolierten cDNA Klonen wurden drei näher untersucht. In allen drei Klonen wurden Sequenzen aus dem S-Genbereich gefunden. Mit einem dieser Klone, pcAL-36, wurde eine HBV-Hybrid mRNA von 2 - 2,3 kb identifiziert, die einige ungewöhnliche und interessante Charakteristika aufweist.

1.1 **Die AL-36 mRNA - ein Transkript der genomischen HBV Integrate AL10.5 oder AL10.7**

Die PLC/PRF/5 Zelllinie weist mindestens sieben HBV Integrate auf, jedoch sind diese Integrate z.T. nicht unabhängig entstanden. Die genomischen Klone AL10.5 und AL10.7 (Koch, 1984) repräsentieren zwei Integrate, die vermutlich durch Duplikation und Rearrangement auseinander hervorgegangen sind. Nicht nur die HBV Sequenzen sind in diesen Integraten identisch, sondern auch 187 bp zellulärer, 3' flankierender Sequenzen. Diese flankierenden Sequenzen erlaubten die Identifizierung der AL-36 mRNA als ein Transkript eines dieser Integrate, denn 124 bp davon wurden in pcAL-36 wiedergefunden. Da daran anschließend zelluläre Sequenzen in der cDNA folgen, welche in den genomischen Klonen nicht vorkommen, muß davon ausgegangen werden, daß es sich um eine gespleißte mRNA handelt. Eine Konsensus Spleißsequenz befindet sich an der entsprechenden Stelle (Position 121) in AL10.5 und AL10.7.

1.2 **Mitochondriale Sequenzen am 5' Ende der AL-36 mRNA**

Während der 3' Terminus von pcAL-36 z.T. bekannten, z.T. neu identifizierten nukleären Sequenzen zugeordnet werden konnte, ist das Zustandekommen der 5' terminalen Sequenzen schwieriger zu

interpretieren, da sie eine 94,9 %ige Homologie zu der kodogenen Sequenz des mitochondrialen Genes URF4 (Anderson, 1981) zeigt. Daß dieser Befund nicht auf ein Klonierungsartefakt zurückzuführen ist, konnte eindeutig durch Nachweis der Hybrid mRNA im Northern Blot gezeigt werden.

Es stellt sich nun die Frage, wie es zur Transkription dieser mRNA kommen konnte und wie das "AL-36 Gen" strukturiert ist. Da die beiden genomischen Klone AL10.5 und AL10.7 in HBV Sequenzen beginnen, ist die genetische Organisation der 5' zu den HBV Sequenzen gelegenen zellulären Sequenzen nicht bekannt. Wenn man jedoch davon ausgeht, daß die AL-36 mRNA ein Transkript eines dieser Intergrate ist, so müssen 5' zu den HBV Sequenzen im Kern mitochondriale Sequenzen vorkommen, von denen das 5' gelegene Exon der AL-36 mRNA transkribiert wurde. Über die Entstehung dieser Genstruktur, insbesondere hinsichtlich der mitochondrialen Sequenzen, kann nur spekuliert werden, da dieser spezielle Genloкус nicht kloniert wurde. Es können zwei Situationen vor der HBV Infektion bzw. Integration angenommen werden: Zum einen können die mitochondrialen Sequenzen, in deren Nähe HBV integrierte, vorher schon im Kerngenom integriert vorgelegen haben, zum anderen kann die Integration dieser mitochondrialen Sequenzen auch im Zuge der HBV Integration erfolgt sein.

1.3 Entstehung des AL-36 Genes

In den siebziger Jahren berichteten einige Autoren über die Replikation von Retroviren in Mitochondrien. Ultrastrukturelle Studien demonstrierten virusähnliche Partikel in Mitochondrien von Zellen, welche mit Retikuloendotheliosis Virus (REV, Balcavage, 1972), C-Typ ähnlichen Retroviren wie dem Elaphe Sarkom Virus (ESV, Lunger, 1973) oder Rous Sarkom Virus (RSV, Kára, 1971) infiziert worden waren. Richert und Hare (1972) zeigten, daß Inhibitoren der Mitochondrienfunktion die RSV Replikation und die maligne Transformation der Zellen hemmen können. Das Hepatitis B Virus zeigt eine enge strukturelle Verwandtschaft zu Retroviren sowohl durch die sehr ähnliche Genomorganisation wie auch durch die reverse Transkription eines RNA Intermediates während der Replikation. HBV könnte nun, ähnlich den oben beschriebenen Retroviren, während der Replikation auch in Mitochondrien zu finden sein, was allerdings bisher nicht gezeigt werden konnte. Wenn dies tatsächlich möglich ist, könnte dort eine Rekombination zwischen HBV Sequenzen und mitochondrialen Sequenzen stattgefunden haben. HBV Sequenzen könnten nun diese mitochondrialen Sequenzen in den Kern transportiert haben und gemeinsam mit diesen in die Wirts-DNA integriert worden sein. Die Exzision einzelner Gene aus dem mitochondrialen Genom und deren Integration in das nukleäre Genom unter bestimmten Streßsituationen der Zelle ist prinzipiell möglich und wird in einem anderen Zusammenhang,

nämlich bei der Seneszenz einiger Pilze, beobachtet (Wright, 1983). Hier wird ein Intron der Cytochromoxydase I als sog. "Sen"-Gen transferiert (Osiewicz, 1984).

Allerdings ist der Replikationsmechanismus des HBV weitgehend aufgeklärt und die einzelnen Schritte konnten bestimmten Zellkompartimenten zugeordnet werden (Summers, 1988, Übersichtsartikel). Wenn HBV überhaupt jemals in Mitochondrien anzutreffen sein sollte, so ist dies sicher eher ein Zufall und nicht Folge eines generellen Mechanismus. Auch über retrovirale Replikation in Mitochondrien wird in der neueren Literatur (nach 1974) nichts mehr berichtet, wie eine retrospektive Literaturrecherche zeigte.

Die Homologie der in pcAL-36 gefundenen Sequenzen des URF4 zu denen im mitochondrialen Genom beträgt nur 94,1 %. Ein Teil der Divergenzen könnte auf inkorrekte reverse Transkription bei der cDNA Synthese zurückzuführen sein, jedoch beträgt hier die Fehlerrate meist weniger als 6%. Die Unterschiede deuten also eher darauf hin, daß die Integration der mitochondrialen Sequenzen in das Kerngenom bereits vor der HBV Integration geschehen ist. Desweiteren befinden sich 18 bp zellulärer Sequenzen zwischen den mitochondrial-ähnlichen und den viralen Sequenzen. Will man nicht annehmen, daß diese durch ein Rearrangement nach der Integration eingefügt worden sind, so sprechen auch sie gegen diese erste Hypothese.

Die Integration der mitochondrialen Sequenzen in das nukleäre Genom kann auch dann gleichzeitig mit den HBV Sequenzen erfolgt sein, wenn sich ganze Mitochondriengenome vor oder während des infektiösen Zyklus des HBV bereits im Kern befunden haben. Die Annahme, daß HBV Sequenzen die mitochondrialen Sequenzen sozusagen als Bote vom Mitochondrium in der Kern transferiert, wäre hier nicht notwendig. Das Vorkommen nicht integrierter mitochondrialer Sequenzen von Genomlänge im Kern wurde für HeLa Zellen beschrieben (Kristensen, 1986) und konnte in dieser Arbeit für PLC/PRF/5 Zellen bestätigt werden. Nach einer Hypothese von Hadler (1974) können Karzinogene die Mitochondrienmembran so verändern, daß die mitochondriale DNA frei wird und in den Kern transloziert werden kann (Pedersen, 1978, Übersichtsartikel). Dies könnte im Fall der Hepatokarzinogenese durch Cofaktoren wie Aflatoxine oder Alkohol bewirkt werden. Unabhängig davon, ob das Vorkommen freier mitochondrialer Genome im Kern typisch für Zellen im Stadium der malignen Entartung ist, oder ob sie generell im Kern zu finden sind, könnte eine Rekombination der viralen DNA mit der mitochondrialen DNA im Kern zeitlich vor der Integration stattgefunden haben. Auch bei dieser Hypothese sind die 18 bp zellulärer DNA zwischen der mitochondrialen und der viralen Sequenz und die "nur" 94,1 %ige Homologie schwer zu erklären.

Am wahrscheinlichsten erscheint eine dritte Hypothese, nach der die in pcAL-36 vorhandenen mitochondrialen Sequenzen bereits vor der viralen Infektion im Kerngenom integriert waren. Dies ist für einige mitochondriale Gene beschrieben worden. Nach den ersten Berichten über mitochondriale Sequenzen im Kerngenom von Pilzen (Wright, 1983) und niederen Tieren, wurden 1983 von Tsuzuki

und Mitarbeitern auch im humanen Genom Sequenzen mit einer deutlichen Homologie zu mitochondrialen Sequenzen beschrieben. Sie entsprechen zwei unterschiedlichen Integraten der 16S ribosomalen DNA und waren von repetitiven bzw. nicht repetitiven nukleären Sequenzen flankiert. In der folgenden Zeit wurde bekannt, daß auch andere mitochondriale Sequenzen, die zu bestimmten Leserahmen, u.a. auch zu einem Teil des URF4, homolog sind, im Kern vorkommen (Fukuda, 1985). Diese URF4 Sequenzen entsprechen jedoch einem anderen Genabschnitt als die in pcAL-36 gefundenen. Die integrierten mitochondrialen Sequenzen können ihrerseits durch Integration repetitiver Sequenzen unterbrochen sein (Nomiyama, 1984; Wakasugi, 1985). Aufgrund der Anzahl positiver Klone nach der Hybridisierung einer genomischen Genbank mit verschiedenen mitochondrialen Sonden und aufgrund der unterschiedlichen flankierenden Sequenzen wurde der Schluß gezogen, daß mindestens einige hundert verschiedener mitochondrialer Kopien im Kern vorliegen (Fukuda, 1985). Es scheint, daß diese Sequenzen über das ganze Genom verteilt vorkommen. Aufgrund der Abweichungen der integrierten mitochondrialen Sequenzen gegenüber denen im Mitochondrium nimmt man an, daß die Integration in der Evolution bis zu 43 Millionen Jahre zurückliegen kann und, da die Homologie der einzelnen Integrate zu den mitochondrialen Sequenzen variiert, ein kontinuierlicher Prozeß ist. Eine Funktion konnte den integrierten mitochondrialen Sequenzen bislang nicht zugeschrieben werden, da sie im Cytoplasma nicht translatiert werden können. Man nimmt an, daß es sich um Pseudogene handelt.

In die Nähe einer solchen Sequenz, die wahrscheinlich länger ist als das in pcAL-36 gefundene Fragment, könnten nun HBV-Sequenzen integriert sein. Da sich auf dieser mitochondrialen Sequenz zwischen den Positionen 11568 und 11514 (entsprechend der Nummerierung des mitochondrialen Genoms) ein klassischer Promotor mit CAAT- und TATA-Box befindet, kann das neu kombinierte Gen transkribiert und an den vorhandenen Spleißsignalen prozessiert werden. Eine Transkription von diesem Promotor aus impliziert, daß am 5' Ende der cDNA ca. 300 bp der mRNA fehlen. Wie weit die Integrationsstelle des HBV von den mitochondrialen Sequenzen entfernt liegt, läßt sich daraus allerdings nicht schließen, da sich auch zwischen der mitochondrialen und der viralen Sequenz eine Spleißstelle befindet und die Größe des Introns nicht bekannt ist. Die Spleiß-Akzeptorstelle liegt bereits in der HBV-Sequenz. Die Sequenzierung von pcAL-36 zeigte, daß die Sequenz CAGT des HBV-Genoms (Position 316) zu CAGG in dem HBV Integrat mutiert ist und dadurch hier diese Spleißstelle entstanden ist. Die 18 bp zellulärer DNA zwischen der mitochondrialen und der viralen Sequenz in pcAL-36 deuten darauf hin, daß die HBV Integration nicht in die genomische mitochondriale Sequenz erfolgte, sondern in deren Nähe, und daß die Spleiß-Donorstelle damit im Bereich "normaler" nukleärer Sequenzen liegt.

1.4

Mögliche Funktionen der AL-36 mRNA

Die mögliche Funktion dieser Hybrid mRNA wirft die gleichen Fragen auf wie die Funktion der mitochondrialen Integrate im Kern überhaupt. Da der genetische Kode der Mitochondrien gegenüber dem universellen genetischen Kode einige Unterschiede aufweist und ein Kodon für ein mitochondriales Tryptophan im Cytoplasma einen Translationsabbruch bewirkt (Buetow, 1978), können keine funktionsfähigen Proteine dieser kerngenomischen mitochondrialen Sequenzen synthetisiert werden. Das gleiche gilt für pcAL-36. Erst der vierte Leserahmen, welcher bei Position 332 der cDNA bereits in HBV Sequenzen beginnt, ist länger als 15 bp. Für eine Translation dieses 199 AS langen Leserahmens müßten mindestens 3 ATG Startkodons überlesen werden. Es ist unwahrscheinlich, daß signifikante Mengen dieses Proteins, welches HBsAg Spezifität mit einer internen Rasterverschiebung über 44 AS aufweist, gebildet werden. Die Translation zweier weiter 3' gelegener Leserahmen signifikanter Länge (Position 414, 124 AS und Position 1089, 190 AS) ist noch unwahrscheinlicher. Diesen theoretischen Überlegungen entsprechend konnte in vitro durch Translation einer in vitro synthetisierten mRNA keine Translation der AL-36 mRNA nachgewiesen werden. Es gibt also aller Wahrscheinlichkeit kein AL-36 spezifisches Protein, welches eine Funktion in der Zelle ausüben könnte.

Möglicherweise erfüllt die AL-36 mRNA ihre Funktion jedoch im Mitochondrium, was einen effizienten Transport der mRNA in die Mitochondrien voraussetzen würde. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß eine im Kern kodierte RNA in die Mitochondrien transportiert wird und dort eine Funktion bei der Replikation des mitochondrialen Genoms ausübt (Chang, 1987). Da die AL-36 mRNA (-)-Polarität hat, ist eine Translation auch im Mitochondrium nicht möglich und sie könnte eine Funktion nur als antisense RNA ausüben. Entsprechend müßte sie in einem großen Überschuß zu der im Mitochondrium synthetisierten sense RNA des URF4 vorliegen. Zudem müßte man, um einen wirklichen Einfluß auf die Zelle zu postulieren, annehmen, daß dieser Überschuß in allen Mitochondrien der Zelle vorhanden ist. Dies würde eine sehr hohe Transkriptionsrate der AL-36 mRNA voraussetzen. Die Menge an mRNA, wie sie sich aus den Northern Daten abschätzen läßt, ist jedoch nicht größer als bei anderen mRNAs. Eine effiziente antisense Funktion dieser mRNA ist auch deshalb nicht zu erwarten, weil das Fragment mitochondrialer Sequenz hierzu möglicherweise zu kurz ist und auch nicht den Translationsstart inhibieren würde.

Es ist also anzunehmen, daß es sich bei der AL-36 mRNA um eine Sequenz handelt, die aufgrund der vorliegenden Transkriptions- und Prozessierungssignale zwar synthetisiert wird, jedoch in der Zelle möglicherweise keine Funktion ausüben kann, da eine Translation nicht möglich ist.

Diese Überlegungen stehen scheinbar im Widerspruch zu früheren Daten, wonach von dem

genomischen Klon AL10.7 eine funktionsfähige mRNA transkribiert und hiervon das S-Antigen translatiert werden kann (Freytag von Loringhoven, 1985). Desweiteren konnte gezeigt werden, daß nach Transfektion dieses Integrates die Expression von Genen in trans stimuliert werden kann (Wollersheim, 1987). In beiden Fällen kommt die AL-36 mRNA nicht für eine Erklärung in Frage, sondern es müssen eine oder zwei weitere mRNAs von AL10.7 transkribiert werden. Als Expressionssignal hierfür kommt zum einen der SPI oder der SPII Promotor in Frage. Die von diesem Promotor aus translatierte mRNA ist wahrscheinlich für die nachgewiesene HBsAg Expression nach Transfektion von AL10.7 verantwortlich und kann möglicherweise auch die HBsAg Expression der PLC/PRF/5 Zelllinie erklären. Die Transaktivierung könnte durch eine mRNA, welche ausgehend vom HBx Promotor aus transkribiert wird, erklärt werden. Die Al-36 mRNA wurde ausgehend von einem dritten Promotor transkribiert, welcher in den 5' zu den HBV-Sequenzen gelegenen mitochondrial-ähnlichen Sequenzen lokalisiert ist, und anschließend gespleißt. Es handelt sich damit um eine dritte mRNA Spezies des AL10.7 Integrates, die im Gegensatz zu den zwei anderen möglicherweise funktionslos ist.

2. EXPRESSION EINES TUMORSPEZIFISCHEN, CYTOPLASMATISCHEN ANTIGENS IN HEPATOZELLULÄREN KARZINOMEN UND ANDEREN TUMOREN

Als tumorspezifisch bezeichnet man Antigene, die in malignen Zellen de novo oder in vermehrtem Ausmaß exprimiert werden. Sie sind ein Ausdruck der Deregulation der zellulären Genexpression, die als ein generelles Merkmal der malignen Entartung einer Zelle angesehen. Dabei kann es sich nicht nur um eine erhöhte, sondern auch um eine verminderte Expression bestimmter Proteine handeln. Die Deregulation kann einerseits für den transformierten Zustand einer Zelle, die Immortalisierung oder das von Wachstumsfaktoren unabhängige Wachstum verantwortlich sein, wie die erhöhte Expression zellulärer Onkogene in einigen Tumoren (Adamson, 1987, Übersichtsartikel). Sie kann andererseits auch eine Folge der malignen Entartung und Dedifferenzierung, möglicherweise ohne Einfluß auf das Tumorgeschehen, sein. Ein Beispiel hierfür ist die reduzierte Expression von Serumalbumin in einigen Hepatomzelllinien (Knowles, 1980). Wird als Folge der Dedifferenzierung jedoch ein Protein der extrazellulären Matrix in vermindertem Umfang synthetisiert, so kann das wiederum Folgen für ein metastasierendes Wachstum der malignen Zellen haben. Es ist daher nicht immer einfach, die tumorspezifische Expression oder Repression zellulärer Gene nach Ursache, Wirkung und Funktion einzuordnen.

2.1

Tumorspezifische Antigene und zelluläre Onkogene

In der Literatur findet man zwei Begriffe für Proteine, welche tumorassoziiert exprimiert werden: Tumorspezifische Antigene und Onkogenprodukte. Was unterscheidet ein tumorspezifisches Antigen von einem zellulären Onkogenprodukt? Zunächst könnte man tumorspezifische Antigene in zwei Gruppen aufteilen: Solche, die als Tumormarker verwendet werden können, die jedoch keine offensichtliche Funktion in der Onkogenese haben oder deren Funktion zur Zeit noch nicht erkannt ist, und solche, die bestimmte Funktionen in der Tumorzelle erfüllen, wie z.B. Phosphorylierung bestimmter Proteine oder Induktion von Mitosen. Erstere sind sicherlich nicht mit Onkogenprodukten zu vergleichen. Ihr Wert besteht in erster Linie in diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten, wie z.B. der Kopplung von Zytostatika an gegen sie gerichtete Antikörper. Letztere jedoch weisen keinen prinzipiellen Unterschied zu Onkogenprodukten auf, der Unterschied liegt lediglich in der Entdeckungsgeschichte.

Die Suche nach Onkogenen ist der experimentelle Ansatz, genetische Veränderungen in einer Tumorzelle auf der Ebene der DNA aufzuspüren. Die DNA, in der ein Onkogen vermutet wird, wird daraufhin untersucht, ob sie Zellen zu transformieren vermag. Eine auf diese Weise als transformierend identifizierte Sequenz wird als Onkogen bezeichnet. Die (erhöhte) Expression von Onkogenen ist in der Regel auf den malignen Zustand und manchmal auf bestimmte Phasen in der Embryonalentwicklung beschränkt, entspricht also den Kriterien für ein tumorspezifisch exprimiertes Antigen.

Mit einem Tumorantigen identifiziert man das Endprodukt einer genetischen Veränderung in der Tumorzelle, sei diese durch Rekombination oder Mutation der DNA oder durch Stimulation der Expression einer Sequenz erfolgt. Es besteht nun die Aufgabe, die Funktion eines solchen Proteins aufzuklären und einen Zusammenhang mit der Onkogenese aufzuzeigen. Erst wenn diese Funktion bekannt ist und nachgewiesen ist, daß diese eine Rolle in der malignen Entartung spielt, kann das entsprechende Antigen als Onkogenprodukt bezeichnet werden. In der Regel setzt dies die Isolierung des Gens und den Nachweis der transformierenden Aktivität voraus.

Während die Proteine vieler Onkogene inzwischen bekannt und gut untersucht sind, sind umgekehrt die Gene tumorspezifischer Antigene nur in sehr wenigen Fällen bekannt. So konnte mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen das gp97 Melanoma assoziierte Antigen die zugehörige mRNA isoliert und mit Hilfe der N-terminalen Sequenz und entsprechenden Oligonukleotiden die cDNA kloniert werden (Rose, 1986). Die Sequenzierung ergab eine Homologie zu Transferrin, einem eisenbindenden Serumprotein, woraufhin gp97 Melanotransferrin genannt wurde. Über die Funktion in den Tumorzellen ist dennoch wenig bekannt.

Ein weiteres Beispiel für ein molekularbiologisch sehr gut charakterisiertes Tumorantigen ist p53 (Rotter, 1985, Übersichtsartikel), welches in fast allen Tumoren und in bestimmten Stadien der Embryonalentwicklung exprimiert wird und DNA bindende Eigenschaften hat. Man nimmt an, daß es für den Wiedereintritt ruhender Zellen in den Zellzyklus verantwortlich sein kann. Auch hier gelang es, nach Polysomenisolierung die cDNA zu klonieren und zu analysieren (Oren, 1983). p53 kann nach Transfektion normale Zellen immortalisieren (Jenkins, 1984) und sie nach Kotransfektion mit aktiviertem c-Ha-ras Onkogen transformieren (Eliyahu, 1984; Parada, 1984). Es kann davon ausgegangen werden, daß p53 direkt an der neoplastischen Transformation beteiligt ist. Das zelluläre Tumorantigen ist damit in die Klasse der nukleären Onkogene einzuordnen.

Obwohl der Weg vom Tumorprotein zum Onkogen schwieriger ist als der umgekehrte, ist er in manchen Fällen der einzig gangbare Weg, wenn es z.B. um die Identifizierung nicht direkt transformierender Gene geht, die aber dennoch in der Tumorzelle eine wichtige Rolle spielen. Ein solcher Fall liegt beim hepatozellulären Karzinom vor. Es ist bisher nur einmal gelungen, durch Transfektion von Hepatomzell-DNA ein Onkogen auf klassische Weise zu isolieren (Ochiya, 1986). Dennoch ist die Annahme berechtigt, daß die veränderte Expression bestimmter zellulärer Gene in der Hepatokarzinogenese eine wichtige Rolle spielt.

2.2 Expression tumorspezifischer Antigene in Hepatomzellen

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper wurde eine Anzahl tumorspezifischer Proteine von Hepatomzellen identifiziert. Da bisher zu keinem dieser Proteine das Gen kloniert ist, ist nicht bekannt, ob es sich um transformierende Gene handelt und welche Funktionen sie ausüben. Von den mindestens 17 mit monoklonalen Antikörpern identifizierten Tumorantigenen aus Hepatomzellen (Carlson, 1985; Wiedmann, 1987; Hu, 1986; Shouval, 1985; Wilson, 1988) sind 16 membranständig. Die meisten sind relativ hepatomspezifisch, einige werden jedoch auch auf anderen Tumoren exprimiert. Das einzige cytoplasmatische Antigen darunter ist nicht näher charakterisiert, da es mit dem verwendeten monoklonalen Antikörper nicht präzipitiert und anschließend gelelektrophoretisch charakterisiert werden konnte (Carlson, 1985). Es konnte jedoch im Radioimmuno-Assay im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden, wird also von den Zellen ins Medium sezerniert. Das in dieser Arbeit beschriebene Antigen PLC-43 wird nicht sezerniert und ist daher verschieden von dem von Carlson beschriebenen.

2.3 Identifizierung eines bisher unbekannten, cytoplasmatischen Tumorantigens in einer humanen Hepatomzelllinie

Durch die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen PLC/PRF/5 Zellen gelang es, ein tumorspezifisches, cytoplasmatisches Antigen (PLC-43) zu identifizieren, welches in seiner Expression nicht auf Hepatome beschränkt ist, sondern vielmehr generell in Tumoren exprimiert wird.

Es wurden eine Reihe humaner und animaler, maligner und nicht maligner Zelllinien und Gewebe auf die Expression von PLC-43 hin untersucht. PLC-43 wurde in allen untersuchten Tumorarten und in transformierten Zelllinien gefunden, während in gesunden Geweben und Zelllinien keine oder nur eine sehr schwache Expression in vier Fällen nachzuweisen war. Das Molekulargewicht des Proteins betrug in allen untersuchten humanen wie animalen Proben 43 kD (p43). Die höchste Expression wurde in humanen Tumorzelllinien gefunden. Die durchwegs niedrigere Expression in solidem Tumorgewebe kann auf einen unterschiedlich großen Anteil an Bindegewebe in den verschiedenen Proben zurückzuführen sein. Auch in animalen Zelllinien war die Expression geringer als in humanen, was darauf beruhen kann, daß das dort exprimierte p43 eine leicht veränderte antigene Struktur aufweist und von dem monoklonalen Antikörper weniger gut erkannt wird. Jedoch war auch im animalen System eine deutliche Korrelation der PLC-43 Expression mit dem transformierten Zustand der Zelle zu erkennen: Während in den untersuchten normalen, jedoch immortalisierten Zelllinien p43 nicht nachzuweisen war, wurde es in den untersuchten malignen oder transformierten Zelllinien exprimiert. Besonders deutlich wird der Unterschied, wenn man NIH3T3 Zellen vergleicht mit solchen NIH3T3 Zellen, die mit verschiedenen Onkogenen transformiert worden waren. PLC-43 wird hier eindeutig im Zuge der malignen Entartung exprimiert. Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel ist die nicht tumorigene Maus-Calvarienzelllinie MC3T3 (Kodama, 1981), welche PLC-43 nicht exprimiert, jedoch nach Infektion mit dem osteogenen Maus-Retrovirus OA Tumore bildet (Schmidt, pers. Mitteilung) und PLC-43 exprimiert. Die Tatsache, daß das Protein in humanen und animalen Tumoren konserviert ist, deutet darauf hin, daß es wahrscheinlich eine generelle Funktion in der Onkogenese erfüllt. Ein Hinweis auf eine mögliche Funktion ergibt sich nach der Sequenzierung dreier tryptischer Peptide aus der etwa 50 %igen Homologie zu pro- und eukaryotischen Elongationsfaktoren (EF-Tu und EF1-alpha; s.u.). Eine Funktion in der Proteinbiosynthese könnte zu der im Vergleich zu normalen Zellen erhöhten Syntheserate in Tumorzellen und damit zu ihrem erhöhten Wachstumspotential beitragen.

Das Expressionsmuster von PLC-43 erinnert an jenes des zellulären Tumorantigens p53, welches erhöht exprimiert in fast allen malignen Zellen und in einigen Stadien der Embryonalentwicklung gefunden wird. Eine starke p53 Expression scheint mit dem voll malignen Zustand der Zelle zu

korrelieren, während in normalem Gewebe eine geringfügige und in sich teilenden Zellen eine leicht erhöhte Expressionsrate gefunden wird (Rotter, 1985, Übersichtsartikel). Die in dieser Arbeit auf PLC-43 hin untersuchten voll transformierten Zellen und soliden Karzinome, Sarkome und haematopoetischen Tumore zeigten mit einer Ausnahme (HL60) eine starke Expression von PLC-43, während es in normalem Gewebe nicht gefunden wurde. Ob hier jedoch eine sehr schwache Expression unter der Nachweisgrenze vorliegt, muß offen bleiben. PLC-43 wurde jedoch in einer normalen, adulten humanen Fibroblastenkultur (8. Passage) gefunden, wobei hier die Expression mit einer erhöhten Mitoserate zusammenhängen könnte. Daß in animalen immortalisierten Zellen nicht auch eine solche schwache Expression nachgewiesen werden konnte, kann daran liegen, daß die antigene Struktur in diesen Zellen leicht verändert und dadurch die Sensitivität der Nachweismethode geringer ist.

Viele tumorspezifische Antigene und Onkogene, u.a. auch das Melanotransferrin (Reisfeld, 1987), p53 (Rotter, 1985), c-fos, c-abl, c-Ha-ras und c-Ki-ras (Müller, 1983) werden in bestimmten Phasen der Embryonalentwicklung exprimiert und haben dort bestimmte Funktionen. Für PLC-43 trifft dies möglicherweise auch zu. Eine schwache Expression konnte in einer embryonalen Fibroblastenkultur nachgewiesen werden. Vorläufige Versuche unter Verwendung der Immunperoxidasefärbetechnik an Kryoschnitten zeigen eine Expression von PLC-43 in 10 - 13 Tage alten Mäuseembryonen im sich entwickelnden Gastrointestinaltrakt. Die Analyse weiterer Mäuseembryonen sowie Embryonen anderer Spezies soll nun zeigen, ob dies möglicherweise eine generelle Bedeutung hat.

2.4

PLC-43 Expression in verschiedenen Stadien der malignen Entartung

Um Aussagen darüber machen zu können, in welchem Stadium der malignen Entartung PLC-43 exprimiert wird und möglicherweise eine Rolle spielt, wurden zwei Experimente durchgeführt. Die Redifferenzierung der PLC/PRF/5-Zellen mit Retinsäure sollte zeigen, ob mit steigender Differenzierung und möglicherweise abnehmender Malignität die PLC-43 Expression sinkt. Die Stimulierung der Zellteilung normaler peripherer Blutlymphozyten, welche das Antigen nicht exprimieren, sollte zeigen, ob ein exogener Mitosestimulus die Expression induzieren kann.

Retinsäure beeinflusst die normale Differenzierung verschiedener Zelltypen wie Epithelzellen, Teratokarzinomzellen (Lockett, 1987) und prämyelotischer Leukämiezellen (Breitmann, 1980). Der maligne Phänotyp vieler Zellen in vitro (Harisiadis, 1978; Merriman, 1979) und die Karzinogenese in vivo (Moon, 1977; Bollag, 1974) können durch Retinsäure unterdrückt werden. Ein ähnlicher Effekt konnte an einer humanen Hepatomzelllinie (SMMC-7721) beobachtet werden: Unter dem Einfluß von Retinsäure im Kulturmedium differenzierten die Hepatomzellen, was sich in einer veränderten

Morphologie, der Synthese von Fibronektin und typischen Leberzellproteinen wie Albumin und Tyrosin-Alphaketoglutarat Transaminase und der verminderten Expression der Hepatomzellmarker Alpha-Fetoprotein und Gamma-Glutamyltransferase zeigte (Chen, 1988).

Wenn nun die Expression von PLC-43, wie die Expressionsstudien nahelegen, mit dem dedifferenzierten und malignen Zustand einer Zelle korreliert ist, sollte bei Retinsäurebehandlung die Expressionsrate sinken. Dies konnte tatsächlich gezeigt werden: Bei Zugabe von Retinsäure zum Kulturmedium von PLC/PRF/5-Zellen sank die im Cytoplasma nachweisbare Menge an PLC-43 zeitabhängig ab. Dies war ein sehr schneller Prozess, da bereits nach zweistündiger Behandlung eine Basislinie der Expression erreicht war. Die Zellmorphologie war auch nach einwöchiger Behandlung nicht offensichtlich verändert und die Zellen teilten sich weiterhin. Die Expressionsrate ist vergleichbar mit der in embryonalen humanen Fibroblastenkulturen. Inwieweit die Malignität der PLC/PRF/5 Zellen durch die Retinsäurebehandlung beeinflusst wird, wurde nicht näher untersucht. Da eine Differenzierung der Tumorzellen und eine abnehmende Malignität jedoch ein genereller Effekt einer Retinsäuretherapie sind, und da dies auch für Hepatomzellen gezeigt werden konnte (Chen, 1988), ist anzunehmen, daß auch PLC/PRF/5 Zellen ähnlich auf eine Retinsäurebehandlung reagieren.

Dieses Ergebnis läßt zwei Schlüsse zu: Erstens ist eine starke Expression von PLC-43 an den voll malignen Zustand der PLC/PRF/5-Zellen gebunden. Während der Differenzierung sinkt die Expressionsrate. Zweitens bleibt eine Basisexpression von PLC-43 auch in den zur Differenzierung induzierten Zellen erhalten. Dies kann einerseits daran liegen, daß die Differenzierung nicht vollständig ist oder daß diese Basismenge an PLC-43 mit der Zellteilung korreliert ist (vergleichbar mit humanen Fibroblastenkulturen). Außerdem sind auch die mit Retinsäure behandelten Zellen nach wie vor immortalisiert und werden nach Absetzen der Behandlung wieder voll maligne (Breitmann, 1980), und eine geringe Expression von PLC-43 könnte typisch für immortalisierte humane Zellen sein.

Das Expressionsmuster von PLC-43 legt nahe, daß, ähnlich wie p53, auch PLC-43 exprimiert wird, wenn eine erhöhte Mitoserate vorliegt. So wird durch Stimulierung peripherer Blutlymphozyten mit PHA und anschließende Kultivierung mit IL-2 die Expression von PLC-43 induziert. PHA bewirkt eine Zellteilung der PBL, die Expression des IL-2 Rezeptors auf der Zelloberfläche und eine Dedifferenzierung zu T-Lymphoblasten (Ruscetti, 1981). In einigen Fällen gelingt es, aus auf diese Weise stimulierten PBL permanente Zellkulturen zu entwickeln. Die PLC-43 Expression ist also, wie die p53 Expression, auch mit der Mitoserate der Zellen korreliert; andererseits kann die Expression jedoch auch mit der Dedifferenzierung zu T-Lymphoblasten zusammenhängen. Obwohl die Zellen durch diese Behandlung nicht immortalisiert werden, kann man doch möglicherweise

davon ausgehen, daß ein permanenter exogener Mitosestimulus die Zellen in einen ähnlichen physiologischen Zustand versetzt, den sie im Anfangsstadium einer Immortalisierung durchlaufen würden.

Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht der Befund, daß auch in zirrhotischer Leber in der Immunfluoreszenz eine deutliche Expression von PLC-43 gefunden wurde. Einerseits findet bei einer Leberzirrhose eine Bindegewebsproliferation mit erhöhter Mitoserate statt, andererseits ist eine Leberzirrhose häufig das Vorstadium eines primären Leberzellkarzinoms. Die Expression von PLC-43 in dem untersuchten Material könnte also durchaus der Ausdruck eines frühen Stadiums der malignen Entartung sein. Da es sich bei den beiden Proben jedoch um Autopsiematerial handelte, kann nicht weiterverfolgt werden, ob sich aus diesen Leberzirrhosen möglicherweise ein HCC entwickelt hätte.

Die vorliegenden Daten zur Expression von PLC-43 in malignen und nicht malignen Zelllinien und Geweben sowie die Versuche zur Mitosestimulierung und zur Differenzierung einer malignen Linie deuten darauf hin, daß p43 bereits in einem sehr frühen Stadium der malignen Entartung exprimiert wird. Bereits in diesem Stadium ist die Proteinbiosynthese wahrscheinlich erhöht oder zumindest dereguliert. Die Expressionsrate kann - im Sinne eines Zwei- oder Mehrstufenmechanismus - anfangs gering sein, im weiteren Verlauf der Transformation steigen und in voll transformierten Zellen maximal werden.

2.5 PLC-43 als Ziel der Transaktivierung durch HBV?

PLC-43 wird in drei von vier HBV positiven Hepatomzelllinien deutlich stärker exprimiert als in drei HBV negativen. In einer HBV negativen Zelllinie (HepG2) wurde nach Transfektion dieser Zelle mit HBV ($H2^{+}$) eine vermehrte Expression beobachtet. Die PLC-43 Expression in $H2^{+}$ -Zellen kann einerseits durch die integriert vorliegenden HBV Sequenzen in trans stimuliert werden, andererseits ist auch eine Aktivierung durch die replizierenden HBV Sequenzen denkbar. In akut mit WHV infiziertem Murmeltierlebergewebe, welches keine WHV Integrate aufweist, konnte keine Expression nachgewiesen werden, so daß naheliegt, daß die Aktivierung der PLC-43 Expression in $H2^{+}$ -Zellen auf die Integrate zurückzuführen ist. Dies könnte darauf hindeuten, daß p43 eines der zellulären Proteine ist, deren Expression durch ein HBV Integrat in "trans" stimuliert werden kann. Wenn dies zutrifft, so ist die PLC-43 Expression während einer akuten HBV Infektion nicht erhöht. Eine Induktion erfolgt erst nach Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom, welche Voraussetzung für eine HBV induzierte Karzinogenese ist. Die PLC-43 Expression könnte in diesem Stadium der malignen Entartung für eine Immortalisierung und möglicherweise Transformation der Zellen durch

Deregulation der Proteinbiosynthese mitverantwortlich sein. Welche der beiden Regionen des HBV, die für eine Transaktivierung in Frage kommen (das HBx-Gen oder die PreS-Region) für diesen Effekt verantwortlich ist, kann aus diesen Experimenten nicht geschlossen werden. Um definitiv zu klären, ob eine Aktivierung der PLC-43-Expression in "trans" durch HBV möglich ist, wäre es notwendig, das entsprechende Gen einschließlich der Promotorregion zu klonieren und einen transaktivierenden Einfluß des HBV auf den Promotor direkt nachzuweisen.

2.6 **Mögliche Funktionen spezifisch exprimierter Elongationsfaktoren in transformierten Zellen**

PLC-43 ist das erste zelluläre Tumorantigen, dem eine mögliche Funktion in der Proteinbiosynthese zugeschrieben werden kann. Vergleiche mit anderen, ähnlichen Proteinen sind daher schwer möglich. Auch liegen bislang keine experimentellen Daten über die tatsächliche Funktion von PLC-43 vor.

Die Proteine vieler zellulärer Onkogene haben in normalen Zellen bestimmte Funktionen, meist in der Regulation von Stoffwechselvorgängen oder in der Signalvermittlung. So entspricht das Onkogen c-erb-B dem EGF Rezeptor, die Onkogene der ras-Familie sind membranständige, GTP-bindende und -hydrolysierende Proteine, welche möglicherweise an der Regulation der Adenylatcyclase beteiligt sind; c-neu, c-fms, c-abl, c-fes und c-src sind Tyrosinkinasen und c-mos ist eine Serin/Threoninkinase. Die nukleären, DNA-bindenden Onkogene wie c-myc oder auch p53 sind an der Regulation von DNA- und RNA-Synthese beteiligt (Adamson, 1987, Übersichtsartikel). So ist es nicht verwunderlich, auch im Bereich der Translation Proteine zu identifizieren, deren normale Form in gesunden Zellen an der normalen Proteinbiosynthese beteiligt ist, von denen aber auch tumorspezifisch exprimierte oder modifizierte Formen existieren, die für die veränderte Proteinbiosynthese in Tumorzellen mitverantwortlich sind. PLC-43 ist diesen Proteinen zuzuordnen.

Die Aktivität der Elongationsfaktoren ist mit dem physiologischen Zustand der Zelle korreliert. Es konnte gezeigt werden, daß die spezifische Aktivität von EF1-alpha mit dem Altern der Zellen in Rattenleber und -hirn abnimmt (Moldave, 1979). Daß veränderte Translationsfaktoren prinzipiell auch in der malignen Entartung eine Rolle spielen können, zeigt sich darin, daß EF1-alpha in SV40 transformierten 3T3B-Zellen etwa 10 mal stärker methyliert ist als in den entsprechenden nicht transformierten Zellen. Die erhöhte Methylierung ist möglicherweise mit der Regulation der Aktivität dieses Faktors korreliert (Coppard, 1983). Welche Rolle dies in der Transformation oder erhöhten Mitoserate hat, ist jedoch nicht klar.

EF1-alpha wie auch EF-Tu katalysieren physiologischerweise die Bindung der Aminoacyl-tRNA an das Ribosom. Die Bindung an die A-Stelle des Ribosoms und die richtige Paarung von Codon und Anticodon benötigt die Bindung von GTP durch EF1-alpha bzw. EF-Tu. Die Ausbildung der Peptidbindung zwischen der naszierenden Polypeptidkette, welche sich an der P-Stelle des Ribosoms befindet, und der neuen Aminosäure, wird dann von einer zweiten Klasse von Elongationsfaktoren, EF1-beta bzw. EF-Ts katalysiert. Hierbei wird GTP hydrolysiert. EF1-alpha bzw. EF-Tu werden frei (Moldave, 1985, Übersichtsartikel).

Eine tumorspezifische Form von EF1-alpha, wie z.B. PLC-43, könnte nun den normalen Faktor kompetitiv verdrängen und seinerseits die entsprechende Funktion ausüben. Eine Veränderung gegenüber dem physiologischen Zustand könnte beispielsweise in einer schnelleren oder festeren Bindung der Aminoacyl-tRNA an das Codon auf der mRNA bestehen oder vielleicht auch in einer schnelleren Dissoziation des Faktors nach der Ausbildung der Peptidbindung, so daß er im Cytoplasma wieder schneller für den Transport weiterer Aminoacyl-tRNAs zur Verfügung steht. Ohne an einen veränderten Wirkungsmechanismus zu denken, ist es aber auch möglich, daß durch das Vorhandensein großer Mengen eines zusätzlichen Elongationsfaktors die Proteinbiosynthese beschleunigt wird. Nicht zuletzt ist es auch denkbar, daß die Synthese bestimmter Proteine vorrangig beschleunigt wird, wenn dieser Faktor z.B. entweder saure oder basische oder hydrophobe Aminoacyl-tRNAs besonders gut zu binden vermag. All diese Fragen können jedoch erst nach der Durchführung entsprechender Versuche geklärt werden.

2.7 Ist PLC-43 ein zelluläres Onkogenprodukt?

Weiter oben wurde bereits ausgeführt, daß ein tumorspezifisches Antigen erst dann als kausal mit der Onkogenese in Verbindung stehend und damit als ein "Onkogenprodukt" bezeichnet werden kann, wenn eine transformierende Aktivität direkt nachgewiesen ist. Das setzt, auch bei bekannter Funktion des Proteins, die Klonierung der cDNA und/oder des entsprechenden Gens voraus. Dies ist nach Isolierung und Sequenzierung des Proteins nun auf verschiedene Weise möglich. Zum einen können den Peptiden entsprechende Oligonukleotide synthetisiert werden, um damit die cDNA-Bank zu hybridisieren. Wahrscheinlich ist es aber auch möglich, die entsprechende cDNA durch Kreuzhybridisierung mit der entsprechenden EF1-alpha- oder EF-Tu-spezifischen Sonde zu identifizieren. Die Identifizierung des Gens einschließlich Promotor wird einer eingehenden Charakterisierung bedürfen. Da es sich um eine Genfamilie handelt, werden sowohl Oligonukleotide als auch die erwähnten kreuzhybridisierenden Sonden auch andere, nicht PLC-43 spezifische Gene erkennen. Da jedoch die Sequenz einiger Peptide von PLC-43 und deren Lage im Protein bekannt ist, ist eine eindeutige Identifizierung durch Nukleotidsequenzierung der entsprechenden Bereiche

der klonierten Sequenz möglich.

Das isolierte Gen soll in weiteren Versuchen auf seine transformierende Aktivität und der Promotor auf eine eventuelle Stimulierbarkeit durch transaktivierende virale Sequenzen hin untersucht werden.

E MATERIAL UND METHODEN

1. MATERIAL

1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamid	Serva
Agarose	Seakem ME
alpha ³² P-dCTP	Amersham
Ampicillin	Sigma
Antikörper, ¹²⁵ I-markierte, gegen Mensch oder Maus Immunglobulin	Amersham
Antikörper, FITC markierte, gegen Maus Immunglobuline	Boehringer
Antikörper, Peroxydase markierte, gegen Maus Immunglobuline	Miles
2,2'Azinobis(3-Ethylbenz- thiazolinsulfonsäure (ABTS)	Sigma
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Biogel A 50	Biorad
Borsäure	Sigma
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galaktosid (X-gal)	Boehringer
Caesiumchlorid	Biomol
CNBr-aktivierte Sepharose C14B	Pharmacia
DE81-Papier	Schleicher & Schüll
DE52-Cellulose	Whatman
Deoxyribonukleotidtriphosphate	Boehringer
Diaminobenzidin	Sigma
Dichlordimethylsilan (DDM)	Merck
Didesoxiribonukleotidtriphosphate	Pharmacia
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck

Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom
EcoRI Linker	Pharmacia
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraazetat (EDTA)	Merck
Ficoll-Paque	Pharmacia
Formamid	Merck
Freundsches Adjuvans	Behring Werke
Geneticin (G418)	Gibco
Hefeextrakt	Difco
Hexaribonukleotide	Pharmacia
In vitro Verpackungs Extrakte	Promega
Interleukin II	Biotest
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Boehringer
Methyloxypropyltrimethylsilan (MPT)	Wacker Chemie
N,N,N',N'-Tetramethylen- ethylendiamin (TEMED)	Serva
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva
Nonidet P40 (NP40)	BRL
Oligo dT Cellulose	BRL
Phenol	BRL
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phytohämagglutinin (PHA)	Gibco
Polyethylenglycol (PEG)	Serva
Protein A Sepharose	Pharmacia
Radiochemikalien	Amersham
Reticulocytenlysat	Promega
Retinsäure	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
RNasin	Amersham
RPMI 1640 Medium	Biochrom
Sarkosyl	Serva
Sephadex G50	Pharmacia
Sequenzierungskit	Biolabs
Sequenzierungsprimer	Pharmacia
Spermidin	Sigma

Alle sonstigen Chemikalien wurden von Merck bezogen und waren von analytischem Reinheitsgrad.

1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme

von Biolabs, Boehringer, BRL und Renner GmbH

Weitere Enzyme

AMV Reverse Transkriptase	BRL
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	Boehringer
DNA Polymerase I	Promega
DNA Polymerase I, Klenow Fragment	BRL
DNase I	Boehringer
E. coli DNA Ligase	BRL
EcoRI Methylase	Biolabs
Lysozym	Sigma
MMTV Reverse Transkriptase	BRL
Proteinase K	Merck
RNase A	Boehringer
RNase H	BRL
S1 Exonuklease	BRL
T4 DNA Ligase	Boehringer
T7 RNA Polymerase	Promega
Trypsin	Seromed

1.3 Biologisches Material

1.3.1 Zelllinien

AG8-653 (Maus Myelomlinie)

Kearney, 1979

Humane Hepatomzelllinien

PLC/PRF/5

Alexander, 1956

HepG2

Aden, 1979

Hep3B

Aden, 1979

huH-4

Huh, 1981

huH-1

Huh, 1981

huH-7

Nakabayashi, 1982

Mahlawu

Alexander, 1974

H2⁺

Sells, 1987

Humane Tumorzelllinien nicht hepatozellulären Ursprungs

TE-85

Osteosarcom

ATCC CRL 1543

HeLa

Cervixkarzinom

Gey, 1952

MCF 7

Mammakarzinom

Brooks, 1973

KaH1/3

Kaposisarkom

Roth, 1988

KaH1/3 x SV40

Kaposisarkom,
SV40 transformiert

1)

Ka1/2

Kaposisarkom

Roth, 1988

HL60

Promyelotische
Leukämie

ATCC CCL 240

Raji

Burkitt

ATCC CCL 86

Lymphom

¹⁾Diese Zelllinie wurde mir freundlicherweise von S. Werner überlassen.

Humane, nicht maligne Zelllinien

Hec	embryonale Fibroblasten	Roth, 1988
HFF	Vorhaut- Fibroblasten	Roth, 1988

Animale Tumorlinien und transformierte Zelllinien

NIH3T3 fos	transformiert mit v-fos	1)
NIH3T3 HA	transformiert mit v-ras	2)
NIH3T3 sis	transformiert mit v-sis	3)
NIH3T3 ras	transformiert mit v-ras	4)
NIH3T3 polyoma	transformiert mit Polyomavirus x HBsAg	5)
F214 NuNu	Fischer rat, transformiert mit Kaposi Sarkom DNA	6)
F11117IIIc	Fischer rat, transformiert mit Polyomavirus x HBsAg	7)
MC3T3-OA	Maus Calvarienzellen,	Schmidt, 1984, Renner, 1988

1)2)3) Diese Zellen wurden mir freundlicherweise von J. Schmidt überlassen.

4)5)6)7) Diese Zelllinien wurden mir freundlicherweise von K. Roth überlassen.

Animale, nicht maligne Zelllinien

NIH3T3	Mausfibroblasten	ATCC CRL1658
BHK-21	Nierenzellen, Hamster	ATCC CCL10
CHO	Ovarialzellen, Hamster	ATCC CCL61
Maus LTK ⁻		
Vero	Nierenzellen, Meerkatze	ATCC CCL81
MC3T3	Maus Calvarienzellen	Kodama, 1981

1.3.2

Gewebe

Maligne und normale menschliche Gewebe aus Autopsien oder Operationen waren Geschenke von Dr. Weiss, Prof. Dr. K. Remberger, Dr. W.H. Caselmann, Dr. H. Will, Prof. Dr. H. Wolf. Woodchuck Lebertumore und nicht malignes Woodchuck Lebergewebe waren Geschenke von Dr. M. Roggendorf.

1.3.3

Bakterienstämme

E. coli Y1090 ⁻	lacU169, proA ⁺ , lon araD139, strA, SupF(trpC22::Tn10), hsdR ⁻ hsdM ⁺ , pMC9 (Young, 1983)
E. coli Y1089 ⁻	lacU169, proA ⁺ , lon araD139, strA, hflA(chr::Tn10), hsdR ⁻ , hsdM ⁺ , pMC9 (pMC9 - pBR322 - lacI ⁺) (Young, 1983)
E. coli JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lambda ⁻ , delta(lac-proAB), (F ⁺ , traD36, proAB, lacIq, Zdelta M15 (Yanisch-Perron, 1985)
E. coli HB101	F ⁻ , hasS20 (r ⁻ _B , m ⁻ _B), recA13, ara14, proA2, lac1, galK2, rpsL20(Sm ^r), xyl-S, mtl-1, supE44, lambda ⁻

13.4 Plasmide

pbluescribe	
pUC19	Yanisch-Perron, 1985
pKSV10	Pharmacia
pHBT119	Roth, 1984
pAG60	Colbere-Garapin, 1979

13.5 Phagen

lambda gt11	Young, 1983
-------------	-------------

2. METHODEN

2.1 ALLGEMEIN BENÖTIGTE PUFFER UND MEDIEN

(spezielle Lösungen sind bei den einzelnen Methoden aufgeführt)

PBS ⁻	140 mM NaCl 30 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
TE	10 mM TrisHCl pH8 1 mM EDTA
TEN	10 mM TrisHCl pH8 1 mM EDTA 100 mM NaCl
TBST	100 mM TrisHCl pH8 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
Phenol	TE gesättigtes Phenol mit 1mg/ml 8-Hydroxychinolin
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	im Verhältnis 25:24:1
Chloroform/ Isoamylalkohol	im Verhältnis 24:1
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat pH 7,0
SM	100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 50 mM TrisHCl pH7,5
LB Medium	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l
LBM Medium	LB Medium mit 10 mM MgCl ₂
LBM Medium	LBM Medium mit 0,2 % Maltose
LB Platten	LB Medium mit 12 g/l Bactoagar
Xgal Indikator- platten	LB Platten mit 1 mM IPTG und 30 mg/l Xgal Falls erforderlich, wurden 100 ug/ul Ampicillin zugesetzt

2.2 ZELLKULTUR

Für eukaryotische Zellen wurde in der Regel Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 50 µg/ml Kanamycin verwendet. Für Hybridomzellen wurde der Glucosegehalt des DMEM von 1,5 auf 4,5% erhöht und außerdem 1 mM Pyruvat sowie 50 µM 2-Mercaptoethanol zugegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ (Hybridomzellen bei 10 % CO₂) gezogen.

Zur Passagierung wurden anhaftend wachsende Zellen mit PBS⁻ gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,25 %/2 mM) abgelöst, mit PBS⁻ gewaschen und mit frischem Medium verdünnt wieder ausgesät. Zur Lagerung wurden die Zellen nach dem Ablösen in Medium mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff biologisch eingefroren.

2.2.1 Transfektion eukaryotischer Zellen

2 x HBS

8	g NaCl
0,36	g KCl
0,19	g Na ₂ PO ₄ x 7 H ₂ O
1	g Glucose
50	g Hepes pH7,12 ad 1 l

1 x 10⁶ Zellen wurden in einer Petrischale (Durchmesser 10 cm) am Tag vor dem Versuch ausgesät. Ca. 3 Stunden vor der Transfektion wurden sie gewaschen und erhielten frisches Medium.

Für einen Ansatz wurden insgesamt 20 µg DNA (die gewünschte Menge an zu transfizierender DNA, mit sonifizierter Kalbsthymus DNA auf 20 µg aufgefüllt) in 225 µl H₂O mit 25 µl 2,5 M CaCl₂ und tropfenweise mit 250 µl 2 x HBS Puffer versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die DNA präzipitierte. Dieses Präzipitat wurde gleichmäßig auf die Zellen gegeben. 18 h nach der Transfektion wurde das Präzipitat durch fünfmaliges Waschen mit PBS⁻ entfernt. Bei Kotransfektionen mit pAG60, einem Plasmid, welches für eine Resistenz gegen G418 kodiert, wurde 2 Tage nach der Transfektion auf G418 resistente Klone selektioniert (500 µg/ml G418 im Medium für NIH3T3 und 600 µg/ml für CCL13).

2.2.2 In vivo Markierung von Zellkulturen mit ³²P

Eine etwa 70 % konfluente Zellkultur wurde für 3 Stunden in phosphatarmem Medium (97 % phosphatfreies DMEM, 3 % DMEM) mit 10 % FCS (dialysiert gegen phosphatfreies Medium) inkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen ein phosphatarmes Medium mit 1 mCi ³²P-

H_3PO_4 /5 ml ausgetauscht. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert, am nächsten Tag 5 mal mit PBS⁺ gewaschen und geerntet.

2.2.3 Isolierung und Kultivierung peripherer Blutlymphozyten (PBL)

Hank's Lösung (ohne Calcium und Magnesium)

1100	mg	Glucose x H_2O
400	mg	KCl
60	mg	KH_2PO_4
8000	mg	NaCl
60	mg	Na_2HPO_4 x 2 H_2O ad 1 l

50 ml frisch entnommenes, heparinisiertes Blut wurde 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert, das Serum gewonnen und aufgehoben und die Interphase ("buffy coat"), welche die Lymphozyten enthält, wurde mit 25 ml DMEM resuspendiert. Zur Abtrennung kontaminierender Erythrozyten wurde die Suspension über 25 ml Ficoll-Paque geschichtet und 20 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Die Lymphozyten bilden dabei eine Interphase, während die Erythrozyten pelletieren. Die Lymphozyten wurden abgenommen und 3 x mit Hank's Lösung gewaschen.

Zur Kultivierung in Suspensionskultur wurden 10^6 PBL/ml in RPMI 1640 Medium mit 10 % autologem Serum für 4 Tage inkubiert. Zur Stimulierung der Zellteilung wurde 0,1 % (v/v) Phytohämagglutinin zugegeben. Nach dieser Zeit wurden die Zellen pelletiert, 3 mal mit RPMI 1640 gewaschen und in einer Dichte von 3×10^5 PBL/ml in RPMI 1640 mit 10 % autologem Serum und 20 % Lymphokult T (= Interleukin II) inkubiert. 1 - 2 mal pro Woche wurde die Kultur auf die ursprüngliche Dichte zurückverdünnt.

2.3 HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN HEPATOMZELLEN (modifiziert nach Köhler, 1976)

2.3.1 Immunisierungsschema

Balb c Mäuse wurden im Alter von 6 Wochen erstmals mit etwa 1×10^7 Hepatomzellen, in diesem Fall mit PLC/PRF/5 Zellen, in komplettem Freundschens Adjuvans intraperitoneal immunisiert. Dazu wurden die Zellen mit 10 mM EDTA in PBS⁻ abgelöst und zur Vereinzelung mehrmals vorsichtig durch eine Kanüle gespritzt. 2 Auffrischinjektionen mit der gleichen Zellmenge in inkomplettem Freundschens Adjuvans folgten jeweils im Abstand von 2 Wochen. 10 Tage nach dem letzten Auffrischinjektionen wurden Serenverdünnungen der immunisierten Mäuse im ELISA getestet. Die Maus mit dem höchsten Antikörpertiter erhielt 14 Tage nach der letzten Immunisierung an 3 aufeinanderfolgenden Tagen nochmals Auffrischinjektionen von 5×10^6 Zellen in PBS⁻, woraufhin am 4 Tag die Milz entnommen und zur Fusion verwendet wurde. Die letzten Immunisierungen erhöhten den Serumtiter im allgemeinen nicht mehr wesentlich, jedoch kann von einer starken Stimulierung der Milzzellen ausgegangen werden.

Mäuse, die nach den Grundimmunisierungen nicht sofort für eine Fusion verwendet wurden, konnten durch Auffrischimmunisierungen noch nach 6 - 9 Monaten zur Antikörperproduktion verwendet werden.

2.3.2 Präparation von Makrophagen als Fütterzellen für Hybridomazellen

Einzelne Hybridomazellen wachsen nicht in normalem, nicht konditionierten Medium, sondern bedürfen der Zugabe von Wachstumsfaktoren. Dies geschieht im einfachsten Fall durch Zugabe von käuflichem Hybridoma Wachstumsfaktor (HECS, human endothelial cell supernatant). Für das erste Aussähen nach der Fusion erwies sich jedoch die Zugabe von Makrophagen als Fütterzellen als besser geeignet, da einerseits ständig die Produktion der Wachstumsfaktoren erfolgt und andererseits das Medium von abgestorbenen Zellen weitgehend rein gehalten wird.

Zur Makrophagenentnahme wurden Balb c oder Swiss Nu/Nu Mäuse durch Brechen der Genicks getötet. Durch Einspritzen von 10 bis 15 ml eiskaltem Medium in die Bauchhöhle und anschließendem Abziehen des Mediums konnten $1 - 5 \times 10^6$ Makrophagen gewonnen werden. Diese wurden abzentrifugiert (5 Min., 1000 rpm) und 1×10^6 Makrophagen in Medium wurden in eine 24 "well" Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Hybridomazellen ausgesät.

2.3.3 Fusion von Mausmilzzellen und Mausmyelomzellen

benötigte Medien:

a: DMEM mit 4,5 % Glucose, 1 mM Pyruvat, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol

b: Medium a, pH 8,5

c: Medium a mit Penicillin und Streptomycin

d: Medium c mit 15 % FCS

HAT-Medium: Medium d mit 13,61 µg/ml Hypoxanthin, 3,88 µg/ml Thymidin, 0,176 µg/ml Aminopterin

Als Vorläufer der späteren antikörperproduzierenden Zellen haben die Milzzellen einer immunisierten Maus die Fähigkeit, spezifische Antikörper zu synthetisieren. Es fehlt ihnen jedoch die Fähigkeit, permanent in Zellkultur zu wachsen. Diese Fähigkeit soll ihnen durch Fusion mit einer Mausmyelomzelle verliehen werden.

Es wurde eine Myelomzelle verwendet (AG8), die freie Nukleoside durch einen Defekt im "Salvage Pathway" nicht verwerten kann. Bei Zugabe von Substanzen wie Aminopterin, die die Neusynthese von Thymidin hemmen, können diese Zellen nicht wachsen. Milzzellen haben diesen Defekt nicht und können zugegebenes Thymidin verwerten. Dies bildet die Basis für die Selektion fusionierter Zellen: In einem Medium, welches Aminopterin sowie Hypoxanthin und Thymidin enthält, können die verwendeten Myelomzellen nicht wachsen. Nur Fusionsprodukte, welche die Eigenschaften der Myelomzelle und der Milzzelle in sich vereinen, können in diesem Medium wachsen.

5 g Polyethylenglykol wurden autoklaviert, in 5 ml Medium b aufgenommen und bei 56 °C im Wasserbad gelöst und dann auf 37 °C gekühlt. AG8 Zellen, die sich in exponentieller Wachstumsphase befanden, wurden 3 x mit Medium a gewaschen und 5 ml Medium b aufgenommen. Der durch Brechen des Genicks getöteten Maus wurde die Milz steril entnommen und 3 mal mit Medium c gespült. In 5 ml Medium c wurden die Milzzellen vorsichtig aus dem Gewebe herausgestrichen. Das Bindegewebe setzte sich in einem Röhrchen in ca. 2 Minuten ab und wurde noch 2 mal mit Medium c gewaschen. Die vereinigten Überstände, die die Milzzellen enthielten, wurden zentrifugiert (5 Min., 1000 rpm), die Milzzellen wurden in 5 ml Medium c aufgenommen, mit den AG8 Zellen vereinigt und pelletiert (5 Min., 1000 rpm). Zur Fusion wurden in das Zellpellet in einem 37 °C Wasserbad 0,8 ml der PEG-Lösung innerhalb von 1 Minute gleichmäßig eingebracht. Bei Raumtemperatur wurden innerhalb von 5 Minuten gleichmäßig 5 ml Medium b zugegeben und untergemischt. Nach schneller Zugabe von weiteren 20 ml Medium B wurde der Fusionsansatz zentrifugiert (5 Min., 1000 rpm), das Pellet in HAT-Medium aufgenommen und auf den (2.3.2) Makrophagen ausgesät. Das Aussähen erfolgte entweder auf 10 Platten mit je 96 kleinen "wells" oder

auf 10 Platten mit je 24 "wells". Nach 1 Woche erhielten die Zellen die gleiche Menge frisches Medium. Nach 3 Wochen wurde die HAT Selektion beendet und die Zellen erhielten Medium d.

2.3.4 Selektion antikörperproduzierender Hybridomzellen

Das Heranwachsen einzelner fusionierter Zellen zu Klonen konnte mikroskopisch beobachtet werden. Wenn die Klongröße ca. 1/10 der Fläche eines "wells" bedeckte, wurde der Mediumüberstand im Westernblot auf die Produktion von anti-PLC/PRF/5 Antikörpern getestet. Positive Klone wurden in einem zweiten Westernblot auf Reaktivität gegen gesunde menschliche Leberzellextrakte getestet.

Klone, die selektiv mit dem PLC/PRF/5 Extrakt reagierten, wurden als spezifisch angesehen und für weitere Untersuchungen verwendet.

2.3.5 Reklonierung von Hybridomzellklonen

Nach der Fusion haben die Hybridomzellen den doppelten normalen Chromosomensatz. Im Laufe der ersten Zellteilungen gehen Chromosomen verloren, bis eine stabile Anzahl erreicht ist. Bei diesem Prozess geht mitunter auch das Chromosom mit dem Antikörperlocus verloren. Eine Zelle, die keinen Antikörper produziert, wächst in der Regel schneller und überwächst die produzierenden Zellen in kurzer Zeit. Es ist daher nötig, die Zellen eines Klones sobald wie möglich wieder zu vereinzeln und die Überstände von Einzelzellklonen erneut auf Antikörperproduktion zu testen. Dies muß solange wiederholt werden, bis alle getesteten Einzelzellklone Produzenten sind. Zu diesem Zweck wurden die Zellen eines Klones in verschiedenen Verdünnungen in eine 96 "well" Platte unter Zugabe von 10 % HECS zum Medium ausgesät, das Entstehen von Einzelzellklonen wurde mikroskopisch beobachtet. Bei einer Klongröße von ca. 200 Zellen konnten die Überstände getestet werden, und positive Klone konnten sofort wieder vereinzelt werden.

Nach der letzten Klonierungsrunde wurden die Zellen zunächst unter Zugabe von 10 % HECS und später unter langsamem Absetzen des Wachstumsfaktor herangezogen. Auch der Serumgehalt im Medium konnte auf 5 % reduziert werden. In diesem Stadium wurden die Klone biologisch eingefroren.

Zur präpativen Gewinnung der Antikörper wurden die Zellen in T175 Flaschen in 200 ml Medium ohne Mediumwechsel ca. 2 Wochen gehalten. Zu diesem Zeitpunkt begannen die Zellen zu sterben und der Antikörpertiter im Medium war maximal.

2.4 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

2.4.1 Herstellung von Proteingesamtzellextrakten

RIPA Puffer

- 1 % Deoxycholat
- 0,1 % SDS
- 1 % NP40
- 10 mM NaHPO₄ pH 7,5
- 10 mM EDTA
- 6 mM PMSF

Zellen aus der Gewebekultur wurden für die Herstellung von Proteingesamtzellextrakten mit 10 mM EDTA in PBS⁻ abgelöst und pelletiert. Das Pellet wurde in 10 Volumen RIPA-Puffer homogenisiert, wobei es zur Zellyse kam, die sich durch steigende Viskosität durch das Freiwerden der DNA anzeigte. Die Lösung wurde so lange durch eine dünne Kanüle gezogen, bis die Viskosität durch Scheren der DNA deutlich verringert war. Zellrümpfer wurden durch 5 minütige Zentrifugation (10000 rpm, SS34 oder Eppendorf-Laborzentrifuge) entfernt und der klare Überstand bei - 20 °C aufgehoben.

Gewebestückchen wurden entweder frisch oder noch in gefrorenem Zustand in RIPA homogenisiert und wie oben beschrieben weiter behandelt.

2.4.2 Herstellung von cytoplasmatischen Proteinextrakten

Lysepuffer

- 150 mM NaCl
- 20 mM TrisHCl pH 7,5
- 1 mM EDTA

Ein Zellpellet wurde in 10 fachem Volumen Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgt durch Zugabe von 10 % NP40 bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % und einminütiges gründliches Mischen. Kerne und Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (SS34, 12000 rpm, 20 Minuten, 4 °C) pelletiert. Der klare Überstand wurde bei -20 °C aufgehoben.

2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Schaffner und Weissmann (Schaffner, 1973)

Puffer 1

1 M TrisHCl pH 7,5
1 % SDS

Puffer 2 (Färbelösung)

45 % Methanol
10 % Essigsäure
45 % H₂O
0,1 % Amidoschwarz 10B

Puffer 3 (Entfärbelösung)

90 % Methanol
2 % Essigsäure
8 % H₂O

Puffer 4 (Elutionslösung)

25 mM NaOH
0,05 mM EDTA
50 % Ethanol

Die zu bestimmenden Proteine wurden in folgendem Ansatz mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert:

5 ul Protein
265 ul H₂O
30 ul Puffer 1
60 ul 60 % TCA

Nach 2 - 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proteine mit Hilfe einer Filterbank auf Nitrozellulosefilter aufgetragen, 2 mal mit 6 % TCA nachgewaschen und anschließend 2 Minuten in Puffer 2 gefärbt. Die Entfärbung erfolgte für 30 Sekunden in H₂O und 4 mal je einer Minute in Puffer 3, anschließend nochmals für 2 Minuten in H₂O. Blau gefärbte Bereiche wurden ausgestanzt und der blaue Farbstoff in Puffer 4 für 15 - 30 Minuten eluiert. Als Referenz diente ein Stück ungefärbtes Filter. Die optische Dichte der Lösung wurde bei 630 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve (Standard BSA Konzentrationen von 1 - 80 mg/ml) bestimmt.

2.4.4 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page, Laemmli, 1970)

Zur gelelektrophoretischen Charakterisierung wurden die Proteine in einem 12,5 %igen Acrylamidgel, dem sogenannten "Trenngel" aufgetrennt. Diesem war ein "Sammelgel" vorgeschaltet. Die Pufferbedingungen in dem Sammelgel sind so gewählt, daß die Proteine selbst Ladungsträger sind und hier noch nicht nach Größe getrennt werden, sondern sich zu einer sehr scharfen Bande sammeln, bevor sie das Trenngel erreichen.

Trenngel 12,5 % Acrylamid

12,5 ml 40 % Acrylamid
1 % Bisacrylamid
10,5 ml H₂O
15,0 ml 1 M Tris HCl pH8,7
0,2 ml 20 % SDS

Sammelgel 5 % Acrylamid

1,3 ml 40 % Acrylamid
1 % Bisacrylamid
7,4 ml H₂O
1,3 ml 1 M Tris HCl pH6,8
50 µl 20 % SDS

Nach dem Entgasen der Lösungen wurden zur Initiation der Polymerisation folgende Lösungen unmittelbar vor dem Gießen des Geles zugesetzt:

0,2 ml 10 % APS
30 µl TEMED

50 µl 10 % APS
8 µl TEMED

Die Lösung für das Trenngel (1,5 mm) wurde zwischen 2 Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wurde es mit dem Sammelgel überschichtet, in das zum späteren Auftragen der Proben ein Kamm gesteckt wurde.

Laufpuffer

25 mM Tris
100 mM Glycin
1 % SDS

5 x Probenpuffer

125 mM Tris HCl pH 6,8
10 % SDS
5 % 2-ME

Die Proteinlösung wurde mit 1/5 Volumen 5 x Probenpuffer versetzt und 5 Minuten gekocht, wodurch Disulfidbrücken reduziert und die Proteine gleichmäßig mit einer negativen Ladung durch das SDS versehen wurden, so daß sie im Gel nur noch nach Größe und nicht mehr nach Ladung aufgetrennt wurden.

In der Regel erfolgte die Auftrennung der Proteine über Nacht bei 20 mA. Als Größenmarker wurden käufliche, vorgefärbte Proteine verwendet.

2.4.4.1 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Färbelösung

27,5 % Methanol
 12,5 % TCA
 60 % H₂O
 0,1 % Coomassie blue R 250

Entfärbelösung

7,5 % Essigsäure
 5 % Methanol
 87,5 % H₂O

Die Gele wurden für ca. 30 Minuten gefärbt und anschließend unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung mehrere Stunden oder über Nacht entfärbt. Banden mit mehr als 250 ng Protein konnten mit dieser Methode sichtbar gemacht werden.

2.4.4.2 Silberfärbung von Proteingelen (Heukeshoven, 1985)

Fixierlösung	Waschlösung 1	Waschlösung 2
30 % Ethanol 10 % Essigsäure	10 % Ethanol	H ₂ O
Färbelösung	Entwickler	Stopplösung
0,2 % AgNO ₃	2,5 % Na ₂ CO ₃ 0,1 % Formaldehyd	1 % Essigsäure

Die Gele wurden 3 Stunden oder länger fixiert, anschließend 3 mal 10 Minuten in Waschlösung 1 und 2 mal 10 Minuten in Waschlösung 2 gewaschen, 30 Minuten gefärbt, kurz mit H₂O gespült und für 5 - 10 Minuten entwickelt, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Die Reaktion wurde durch 5 minütige Inkubation in der Stopplösung beendet. Die Gele wurden anschließend noch 2 mal 10 Minuten in H₂O gewaschen. Mit dieser Methode konnten Banden mit mehr als 10 ng Protein sichtbar gemacht werden.

2.4.5 **Aufreinigung Monoklonaler Antikörper**

2.4.5.1 **Anreicherung der Immunglobuline aus Medienüberständen**

Die Proteine des Medienüberstandes wurden durch eine Ammoniumsulfatfällung zunächst konzentriert. Bei Halbsättigung fallen Immunglobuline fast vollständig aus, während einige andere Proteine noch in Lösung bleiben. Man kann hierdurch also bereits eine Anreicherung der Antikörper erreichen.

Ammoniumsulfat (30 g/100 ml Medium) wurde langsam unter Eiskühlung eingerührt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis waren die Immunglobuline ausgefällt und konnten pelletiert werden (GS3, 4 °C, 8000 rpm, 30 Minuten). Das Pellet wurde in PBS⁻ aufgenommen und gegen PBS⁻ und später gegen Binde-Puffer (s.u.) dialysiert.

2.4.5.2 **Reinigung der Immunglobuline**

Die Reinigung erfolgte über Protein A Sepharose. Protein A ist ein Protein aus *Staphylococcus aureus*, welches Immunglobuline spezifisch binden kann. Die Elution der Immunglobuline kann selektiv durch Citratlösungen verschiedener pH-Werte erfolgen. Das in dieser Arbeit gereinigte IgG2b eluiert bei pH4.

Binde-Puffer

1,5 M Glycin
3 M NaCl pH 8,9

Elutionspuffer für IgG2b

100 mM Natriumcitrat pH 4

Eine Protein A Sepharose-Säule (ca. 1 ml Volumen) wurde in Binde-Puffer äquilibriert und die Antikörperlösung in Bindepuffer aufgetragen. Die Säule wurde mit Bindepuffer gewaschen, bis die Extinktion der Waschlösung bei 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine) konstant blieb. Die Elution erfolgte mit 100 mM Na-Citrat pH 4 und wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm verfolgt. Die eluierten Antikörper wurden unmittelbar mit 2 M Tris HCl pH 8 neutralisiert, um eine mögliche Denaturierung zu vermeiden. Bei Waschversuchen mit Citratpuffer pH 5 zeigte sich, dass bereits nach dem Waschen mit Binde-Puffer praktisch keine Fremdproteine mehr gebunden waren, daß jedoch ein erheblicher Anteil der IgG2b Moleküle bei pH 5 bereits eluiert wurden. Auf diesen Waschschritt wurde daher verzichtet.

2.5 IMMUNOLOGISCHE NACHWEISMETHODEN

2.5.1 Western Blot (Towbin, 1979)

Bei diesem Verfahren werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch ein elektrisches Feld auf Nitrozellulose übertragen. Antigene können durch Behandlung mit entsprechenden Antikörpern sichtbar gemacht werden. In der Regel wird hier eine indirekte Nachweismethode verwendet, bei der gegen das Antigen gerichtete Antikörper nicht markiert ist. Ein zweiter, gegen den ersten Antikörper gerichteter Antikörper, kann verschieden markiert sein. In dieser Arbeit wurden als zweite Antikörper ^{125}J oder Peroxidase markierte Antikörper gegen Maus- oder Kaninchen IgG verwendet.

2.5.1.1 Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose

Transferpuffer

20 mM Tris
150 mM Glycin

Zum Elektrottransfer wurde die "Sartoblot" Apparatur der Firma Sartorius verwendet, die einen Transfer der Proteine innerhalb von 2 Stunden bei 200 mA erlaubt. Als Pufferreservoir dienten in Transferpuffer getränkte Whatman 3MM Filterpapiere.

Die fertigen NC Filter wurden entweder direkt für die Antikörperreaktion eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung trocken bei Raumtemperatur gelagert.

2.5.1.2 Antikörperreaktion

TBST

150 mM NaCl
50 mM TrisHCl pH 8
0,1 % Tween 20

Absättigungspuffer

0,2 % Gelatine
2 % BSA
in TBST

Farbstofflösung

0,05 % Diaminobenzidin in 100 mM KH_2PO_4 , pH7 mit 0,15 % H_2O_2

Die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose wurden zunächst durch 15 minütige

Inkubation im Absättigungspuffer blockiert. Daraufhin wurde das Filter für 1 Stunde mit dem ersten Antikörper in TBST/10 % Absättigungspuffer inkubiert, anschließend 3 mal 5 Minuten in TBST gewaschen und über Nacht (^{125}J , 0,1 uCi/ml) oder für 1 Stunde (Peroxidase) mit dem 2. Antikörper inkubiert und wieder 3 mal 5 Minuten in TBST gewaschen. Bei ^{125}J Markierung wurde der Röntgenfilm in der Regel über Nacht exponiert. Bei Peroxidasemarkierung wurde die Enzymaktivität zur Bildung eines unlöslichen, braunen Farbstoffpräzipitates an der Stelle der Bande genutzt. Nach dem letzten TBST Waschschrift wurde 5 Minuten in PBS^- gewaschen und die Farbstofflösung zugegeben. Die Banden wurden in der Regel nach 2 bis 5 Minuten sichtbar, anschließend wurde die Reaktion durch kurzes Waschen in H_2O werden.

2.5.2

ELISA

(Enzyme linked immunosorbent assay)

Puffer 1

150 mM NaCl
0,1 % Tween 20

Puffer 2

30 mM Na-Citrat
40 mM NaH_2PO_4 , pH 4,2
0,03 % H_2O_2

Farbstofflösung

1 mg/ml ABTS in Puffer 2 mit 0,03 % H_2O_2

Am Vorabend des Versuches wurde eine Mikrotiterplatte mit 96 "wells" mit Antigen beschichtet (250 ng/"well" in PBS^-) und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Lösung abgenommen und die "wells" 3 mal mit Puffer 1 gewaschen. Unspezifische Proteinbindungsstellen des Kunststoffes wurden durch einstündige Inkubation mit 2 % BSA in Puffer 1 abgesättigt, die "wells" erneut einmal mit Puffer 1 gewaschen. Es folgte Inkubation mit einem ersten Antikörper in Puffer 1 für 1 Stunde, 3 Waschschrift mit Lösung 1 und Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten 2. Antikörper ebenfalls für eine Stunde. Die "wells" wurden viermal mit Puffer 1 und einmal mit Puffer 2 gewaschen. Anschließend wurde die Farbstofflösung zugegeben, woraufhin sich innerhalb einer halben bis einer Stunde ein blaugrüner löslicher Farbstoff entwickelte, dessen Intensität im "ELISA reader" (Ear 400, SLT-Labinstruments, Austria) bei 405 nm photometrisch gemessen wurde.

2.5.3 Immunfluoreszenz

Durch Immunfluoreszenz kann ein Antigen in der Zelle oder in Gewebeschnitten angefärbt und so dessen intrazelluläre Lokalisation bestimmt werden. Auch hier wird wie im Western Blot oder im ELISA in einem Sandwich-Verfahren gearbeitet, wobei der 2. Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat, FITC) markiert ist.

2.5.3.1 Vorbereitung von Zellen für die Immunfluoreszenz

Objektträger wurden mit einem herkömmlichen Scheuerpulver oberflächlich angeraut, gut mit destilliertem Wasser gespült und autoklaviert. Sie wurden in eine Petrischale gelegt und darin wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz ausgesät. Wenn der Zellrasen etwa 50 % konfluent war, wurden die Objektträger mit PBS⁻ gewaschen und die Zellen in Ethanol/Aceton (50:50) für 20 Minuten fixiert. Sie wurden entweder direkt verwendet oder bei - 20 °C aufgehoben.

2.5.3.2 Vorbereitung von Gewebeschnitten für die Immunfluoreszenz

In Paraffin eingebettete, formaldehydfixierte Schnitte wurden durch folgende Alkoholreihe deparaffinisiert (Inkubation jeweils für 10 Minuten):

100 % Xylol
 50 % Xylol / 50 % Ethanol
 96 % Ethanol
 90 % Ethanol / 10 % PBS⁻
 70 % Ethanol / 30 % PBS⁻
 30 % Ethanol / 70 % PBS⁻
 10 % Ethanol / 90 % PBS⁻
 PBS⁻

Anschließend wurde direkt die Immunfluoreszenz durchgeführt.

Von frischem oder tiefgefrorenem Gewebe wurden Kryoschnitte von 6 - 10 um Dicke angefertigt. Diese wurden für 20 Minuten in Ethanol/Aceton (50:50) fixiert.

2.5.3.3 Antikörperreaktion

Nach Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit 10 % FCS in PBS⁻ wurden 20 µl Antikörperlösung (10 - 50 µg/ml in PBS⁻) aufgetragen, die Objektträger in eine feuchte Kammer gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 3 maligem Waschen in PBS⁻ wurde der zweite, FITC markierte Antikörper in der gleichen Weise aufgetragen und für 3 - 5 Stunden inkubiert. Da der Fluoreszenzfarbstoff leicht ausbleicht, wurden die weiteren Schritte im Halbdunkel durchgeführt. Abschließend wurde 3 mal mit PBS⁻ gewaschen, ein Fluoreszenzstabilisator aufgetragen und Deckgläschen aufgeklebt.

Das Betrachten und Fotografieren der Präparate erfolgte entweder sofort oder diese wurden im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

2.5.4 Immunperoxidasefärbung von Zellen und Gewebeschnitten

Für eine Immunfluoreszenz vorbereitete Zellen (2.5.3) konnten auch für eine Immunperoxidasefärbung eingesetzt werden. Um endogene Peroxidasen zu hemmen, wurden die Präparate für 20 Minuten in 0,5 % H₂O₂ in Methanol inkubiert. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden mit 20 % FCS in PBS⁻ abgesättigt. Anschließend wurde die Antikörperreaktion in der gleichen Weise wie bei einer Immunfluoreszenz durchgeführt. Der 2. Antikörper war anstatt mit FITC mit Peroxidase gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁻ wurde die Farbstofflösung (0,05 % Diaminobenzidin in 100 mM KH₂PO₄, pH7, 0,15 % H₂O₂) aufgetragen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Präparate in H₂O₂ gewaschen, für 1 Minute mit Meyer's Hämalaun gegengefärbt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Präparate wurden durch ein Phasenkontrastmikroskop betrachtet und fotografiert.

2.6 ANTIGENISOLIERUNG DURCH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Monospezifische Antikörper können auf 2 verschiedene Weisen für die Isolierung des entsprechenden Antigens verwendet werden. Zum einen können sie kovalent über reaktive Gruppen an ein Säulenmaterial wie Sepharose gebunden werden, zum anderen kann die hohe Affinität der Immunglobuline an Protein A ausgenutzt werden.

2.6.1

Kopplung von Immunglobulinen an CNBr-aktivierte Sepharose CL 4B

(Herstellung einer spezifischen Affinitätschromatographiesäule: Sepharose CL4B-68)

Kupplungspuffer	Waschpuffer I	Waschpuffer II
0,1 M NaHCO ₃	0,1 M Na-Acetat	0,1 M TrisHCl
0,5 M NaCl	0,5 M NaCl	0,5 M NaCl
pH 8,3	pH 4	pH 8

CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde in 1 mM HCl resuspendiert und ca. 15 Minuten darin gewaschen. Anschließend wurde das gequollene Säulenmaterial in Kupplungspuffer aufgenommen. Für 1 g Trockengewicht wurden 1 mg gereinigter monoklonaler Antikörper über Nacht gegen Kupplungspuffer dialysiert, mit dem Säulenmaterial gemischt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde mit Kupplungspuffer herausgewaschen und überschüssige reaktive Gruppen wurden mit 0,1 M TrisHCl pH 8 blockiert. Das Säulenmaterial Sepharose CL4B-68) wurde anschließend jeweils 4 mal abwechselnd mit Waschpuffer 1 und 2 gewaschen und in PBS⁻ mit 0,1 % NaN₃ aufgehoben.

2.6.1.1

Isolierung des Antigens mit Hilfe von Sepharose CL4B-68

Das Säulenmaterial wurde gut in TBST gewaschen und in eine kleine Säule gepackt (ca. 0,5 ml, Säulendurchmesser 0,5 cm). Der cytoplasmatische Überstand von PLC/PRF/5 Zellen (2.4.2) wurde in TBST zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml Protein verdünnt und über Nacht über die Säule gepumpt. Die Säule wurde mit mindestens 50 Volumina TBST gewaschen, die gebundenen Proteine mit 0,1 M GlycinHCl pH 2,5 eluiert, in Fraktionen gesammelt und mit 2 M Tris pH 11 neutralisiert. Wasch- und Elutionsschritte wurden über Messung der Extinktion bei 280 nm verfolgt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Gehalt an Antigen im Westernblot getestet.

2.6.2 Isolierung des Antigens mit von Protein A Sepharose CL 4B

2.6.2.1 Isolierung durch Säulenchromatographie

Käufliche Protein A Sepharose CL 4B wurde in eine Säule gepackt (0,5 ml, Säulendurchmesser 0,5 cm) und mit Bindepuffer (2.4.5.2) äquilibriert. Es wurden 100 µg gereinigter Antikörper in 20 ml Bindepuffer auf die Säule gegeben und die Säule anschließend mit Bindepuffer und dann mit TBST gewaschen, bis die UV Absorption bei 280 nm konstant blieb. Cytoplasmatischer Überstand aus PLC/PRF/5 Zellen (2.4.2) wurde in einer Konzentration von 0,5 mg/ml Protein in TBST über Nacht über die Säule gepumpt. Die Säule wurde anschließend so lange mit TBST gewaschen, bis die UV Absorption bei 280 nm wiederum konstant blieb. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit 10 mM oder 100 mM Natriumcitrat pH4 eluiert. Die Fraktionen wurden sofort durch vorgelegtes 2 M Tris pH 11 neutralisiert, um eine Denaturierung zu vermeiden, und anschließend im Westernblot auf ihren Antigengehalt getestet.

2.6.2.2 Isolierung im Batch Verfahren

0,1 ml Protein A Sepharose CL 4B wurde in Bindepuffer (2.4.5.2) äquilibriert und mit unterschiedlichen Mengen gereinigtem Antikörper in Bindepuffer beladen (ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur). Überschüssiger Antikörper wurde durch 5 maliges Waschen mit TBST und anschließende Zentrifugation entfernt. Cytoplasmatischer Überstand von PLC/PRF/5 Zellen (2.4.2) wurde auf eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml in TBST verdünnt und mit der antikörperbeladenen Protein A Sepharose für 2 h bei Raumtemperatur unter Drehen auf einem Rad inkubiert. Das Chromatographiematerial wurde anschließend 10 mal mit TBST gewaschen. Die Elution erfolgt für 30 Sekunden mit 10 mM Natriumcitrat pH 4. Das Eluat wurde unmittelbar danach mit 2 M Tris pH 11 neutralisiert und auf 174 Volumen eingeeengt. Der Antigengehalt im Eluat wurde durch Westernblot überprüft.

Da das Protein zum Sequenzieren möglichst salzfrei sein sollte, wurde die Elution zu diesem Zweck mit 0,1 % TFA durchgeführt, welches zusammen mit dem Wasser in der Vakuumzentrifuge vollständig verdampft. Das Protein wurde anschließend in Probenpuffer für ein Polyacrylamidgel aufgenommen.

2.7 ISOLIERUNG VON RNA

Alle Lösungen, die kein Tris enthielten, wurden über Nacht mit 0,1 % DEPC inkubiert und autoklaviert. Glaswaren wurden für 8 Stunden bei 220 °C gebacken.

2.7.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen (Favorolo, 1980)

Lysepuffer	2 x PK-Puffer
140 mM NaCl	200 mM TrisHCl pH7,5
1,5 mM MgCl ₂	25 mM EDTA
10 mM TrisHCl pH8	300 mM NaCl
5 mM DTT	2 % SDS

Zellen aus der Gewebekultur wurden mit 20 mM EDTA in PBS⁻ abgelöst und pelletiert. Das Zellpellet wurde 2 mal in PBS⁻ gewaschen und anschließend in 10 Volumen Lysepuffer mit 500 u/ml RNasin resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 10 % NP40 bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % und gründlichem Mischen für 1 Minute. Kerne und Mitochondrien wurden pelletiert (Eppendorfsentrifuge, 13000 rpm, 20 Minuten, 4 °C) und der zytoplasmatische Überstand mit dem gleichen Volumen 2 x PK Puffer versetzt. Proteinase K (10 mg/ml in 10 mM TrisHCl pH 7,8, 2 h bei 37 °C vorverdaut) wurde bis zu einer Endkonzentration von 250 ug/ml zugegeben und der Ansatz für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde 2 - 3 mal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 2 mal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, die RNA mit 2 Volumina Ethanol präzipitiert und durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde je nach Verwendungszweck in 0,1 % SDS oder in Wasser aufgenommen. Die Aufbewahrung von RNA erfolgte unter Ethanol bei -70 °C.

2.7.2 Isolierung von RNA aus Gewebe (Auffray, 1980)

Puffer I	Puffer II	Puffer III
3 M LiCl	4 M LiCl	50 mM Na-Acetat
6 M Harnstoff	8 M Harnstoff	1 % SDS
10 mM Na-Acetat		
200 ug/ml Heparin		
0,1 % SDS		

Ein Gewebestückchen wurde im 20fachen Volumen Puffer I mit dem Ultrathurrax 6 x 30 Sek. homogenisiert und über Nacht auf Eis inkubiert. Die ausgefallene RNA wurde pelletiert (15 Minuten, 12000 rpm, SS34) und das Pellet 3 mal mit Puffer 2 gewaschen. Die RNA wurde in Puffer

III aufgenommen, zweimal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert.

2.7.3 Isolierung polyadenylierter RNA aus Gesamt-RNA (Aviv, 1972)

Puffer I

0,1 M NaOH
5 mM EDTA

Puffer II

20 mM TrisHCl pH7,6
500 mM NaCl
1 mM EDTA
0,1 % SDS

Puffer III

20 mM TrisHCl pH7,6
100 mM NaCl
1 mM EDTA
0,1 % SDS

Puffer IV

10 mM TrisHCl pH7,6
1 mM EDTA
0,05 % SDS

Eine Säule mit 0,3 cm Durchmesser wurde mit ca. 0,2 ml Oligo dT Zellulose gepackt und mit 5 Volumina Puffer I, 10 Volumina H_2O und 10 Volumina Puffer II gewaschen. Die in 0,1 % SDS gelöste RNA wurde für 10 Minuten bei 68 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit dem gleichen Volumen doppelt konzentriertem Puffer II versetzt. Diese Lösung wurde 2 - 3 mal über die Säule gegeben, wobei die RNA zwischen jedem Schritt nochmal auf 68 °C erhitzt wurde. Die Säule wurde mit 20 Volumina Puffer III gewaschen, bevor die Poly A⁺ mit 3 Volumina Puffer IV eluiert wurde. Aus einem kleinen Aliquot des Eluats wurde die RNA Konzentration bestimmt. Die RNA wurde mit Ethanol gefällt und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C aufgehoben. Die Intaktheit der mRNA wurde indirekt durch Überprüfung der Intaktheit der ribosomalen RNA im Wascheluat durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.8 ELEKTROPHORESE VON RNA

Sollte nur die Intaktheit der RNA überprüft werden, wurde 1 µg native RNA auf einem 1 %igen Agarosegel in 10 mM Natriumphosphat pH 7 aufgetrennt und mit Ethidiumbromid im UV Licht detektiert.

Sollte die aufgetrennte RNA später auf Nitrozellulose übertragen und hybridisiert (Northern Blot, 2.9) werden, wurde sie vorher denaturiert, da nur so eine exakte Größenbestimmung der RNA möglich ist. (McMaster, 1977)

Denaturierungspuffer:	1 M Glyoxal
	50 % DMSO
	10 mM Na-Phosphat pH7

Die zu ladende RNA Menge wurde präzipitiert, das Pellet in 16 µl Denaturierungspuffer aufgenommen und für 60 Minuten bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl RNase freier Auftragspuffer (2.11) zugegeben und die Proben geladen. Die Elektrophorese erfolgte für 5 - 6 Stunden bei 70 Volt in einem 1 %igen Agarosegel in 10 mM Natriumphosphat pH 7. Als Größenmarker wurde eine Mischung von 8 RNAs bekannter Länge oder ribosomale 18 und 28 S RNA verwendet.

2.9 TRANSFER VON RNA AUS AGAROSEGELEN AUF NITROZELLULOSE ("NORTHERN BLOT")

Die RNA kann durch Kapillarblotting aus dem Gel auf Nitrozellulose übertragen werden. Dazu wurde das Gel umgekehrt auf einen in 20 x SSC getränkten Schwamm und 3 Lagen Whatman 3MM Papier gelegt, darauf die in 20 x SSC getränkte Nitrozellulose und nochmals 3 Lagen Whatman 3MM Papier. Ein Diffusionsstrom von unten durch das Gel zur Nitrozellulose wurde durch Auflegen von saugfähigem Papier und Beschwenen mit ca. 500 g erreicht. In diesem Flüssigkeitsstrom diffundiert die RNA aus dem Gel und bleibt unter den gewählten Salzbedingung an der Nitrozellulose gebunden. Der Transfer war nach 16 - 20 Stunden beendet, der Nitrozellulosefilter wurde anschließend für 1 Stunde im Vakuum bei 80 °C gebacken.

2.10 DNA-ISOLIERUNGEN

2.10.1 Fällen und Lösen von Nukleinsäuren

Zur Präzipitation von DNA wurde eine wässrige Lösung auf eine Endkonzentration von 2 M Ammoniumacetat eingestellt und die DNA durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol oder 0,7 Volumen Isopropanol ausgefällt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA pelletiert (SS34, 12000 rpm, 10 - 60 Minuten, 4 °C). Das Nukleinsäurepellet wurde kurz mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem adäquaten Volumen Wasser (RNA) oder TE (DNA) aufgenommen.

2.10.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte in einem Beckman DU-65 Photometer bei 260 nm mit dem NAQ1 Programm. Die Relation der optischen Dichten bei 260 und 280 nm ergibt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure, wobei die Lösung bei einem Verhältnis $> 1,8$ als proteinfrei angesehen werden kann.

2.10.3 Präparation von Plasmid DNA durch alkalische Lyse

Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3
50 mM Glucose	200 mM NaOH	3 M Kaliumacetat pH4,8
25 mM TrisHCl pH 8	1 % SDS	
10 mM EDTA		
5 mg/ml Lysozym		

400 - 800 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, wurden mit plasmidhaltigen Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden pelletiert (GS3, 6000 rpm, 10 Minuten, 4 °C). Das Pellet aus 400 ml Kulturmedium wurde in 7 ml Puffer 1 resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das Lysozym wurde die Zellwand der Bakterien angedaut. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 14 ml Puffer 2 und 5 minütige Inkubation auf Eis. Mit 10 ml kaltem Puffer 3 wurden die Zelltrümmer mit einem Großteil der daran gebundenen Bakterienchromosomen und Proteine gefällt und nach 5 minütiger Inkubation auf Eis durch Zentrifugation (SS34, 12000 rpm, 30 Minuten, 4 °C) pelletiert. Aus dem Überstand wurden die Plasmide durch Zugabe von 0,8 Volumen Ethanol ausgefällt und durch Zentrifugation (SS34, 12000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) pelletiert. Das Plasmidpellet wurde in 9 ml TE gelöst, mit 10 g CsCl und 100 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und in "Quickseal" Zentrifugenröhrchen gefüllt. Durch

Ultrazentrifugation (Ti 60, 45000 rpm, 36 - 48 h, 18 °C) wurden in dem sich einstellenden CsCl-Gradienten die chromosomale und die Plasmid-DNA unterschiedlich bandiert und getrennt. Zunächst wurde die obere Bande chromosomaler DNA, daraufhin die Plasmidbande mit einer Kanüle entnommen. Durch 3 - 4 malige Extraktion mit primärem Butanol wurde das Ethidiumbromid entfernt. Die DNA wurde entweder über Nacht gegen TE dialysiert, oder 1:2 mit TE verdünnt und mit Ethanol bei Raumtemperatur gefällt. Das Pellet wurde in TE aufgenommen, zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 2 mal Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und nach Zugabe von Ammoniumacetat gefällt. Die durchschnittliche Plasmidausbeute mit dieser Methode lag bei 1 - 2 mg Plasmid aus 800 ml Kultur.

2.10.4 Plasmidschnellpräparation (Birnboim, 1979)

Mit dieser Methoden wurden Plasmide aus 1,5 ml Kulturen isoliert, wenn diese für Charakterisierungszwecke nur in geringer Menge und schnell gebraucht wurden.

Die verwendeten Lösungen waren die gleichen wie für eine normale Plasmidpräparation (2.10.3).

Die Bakterien wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß für 20 Sekunden pelletiert, anschließend in 100 µl Puffer 1 resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lyse erfolgte mit 200 µl Puffer 2, Zelltrümmer und Proteine wurden mit 150 µl Puffer 3 ausgefällt. Die Zelltrümmer wurden für 2 Minuten pelletiert und die DNA aus dem Überstand präzipitiert. Das Pellet wurde in TE aufgenommen, einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, die DNA nochmals gefällt und anschließend in 50' µl TE aufgenommen. Für einen Restriktionsansatz wurden 7 µl dieser Lösung verwendet, ohne die exakte DNA Menge zu bestimmen, wobei 100 µg/ml RNase zugegeben wurden.

2.10.5 Isolierung chromosomaler DNA aus eukaryotischen Zellen oder Geweben (Perucho, 1981)

Puffer 1

150 mM NaCl
10 mM EDTA
10 mM TrisHCl pH 7,5

Puffer 2

650 mM NaCl
10 mM EDTA
10 mM TrisHCl pH 7,5

Ein Zellpellet oder ein zerkleinertes Gewebestück wurde in dem 10fachen Volumen Puffer 1 mit 200 µg/ml Proteinase K homogenisiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von SDS bis zu einer Endkonzentration von 0,5 %, wobei die Viskosität der Lösung durch die freiwerdende

chromosomale DNA sofort sehr hoch wurde. Von jetzt an erfolgten alle weiteren Schritte sehr vorsichtig, um die DNA nicht zu scheren. In allen weiteren Schritten wurde darauf geachtet, die DNA nicht zu scheren.

Die DNA wurde für 20 Minuten bei 68 °C und für 2 - 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Wenn die Lösung sehr viskös war, wurde sie mit dem gleichen Volumen Puffer 2 verdünnt, ansonsten wurde sofort mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol über Nacht bei 37 °C extrahiert. Die Lösung wurde ein zweites mal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol für 3 - 6 Stunden und anschließend für 1 Stunde mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol gefällt. Das flockige Präzipitat in ein frisches Gefäß transferiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen, die DNA getrocknet und in TE aufgenommen.

2.10.6 Präparation von DNA aus Zellkernen

Puffer 1

10 mM TrisHCl pH7,4
0,1mM EDTA
10 mM NaCl
1 mM DTT
5 mM MgCl₂

Puffer 2

250 mM Saccharose
3 mM CaCl₂

Puffer 3

340 mM Saccharose
3 mM CaCl₂

Puffer 4

2,4 mM Saccharose
3 mM CaCl₂

Ein Zellpellet oder Gewebe wurde im 5fachen Volumen Puffer 1 homogenisiert. Dabei platzten die Zellen, jedoch blieben die Kerne intakt. Sie wurden bei 2500 rpm für 10 Minuten pelletiert. Das Kernpellet wurde zweimal mit TEN gewaschen und anschließend in 1 ml Puffer 2 aufgenommen. Die Suspension wurde mit 1 ml Puffer 3 unterlegt und die Kerne wurden durch dieses Saccharosekissen hindurch pelletiert (10 Minuten, 1500 g), wodurch die Kerne bereits weitgehend von anderen zellulären Bestandteilen befreit wurden. Das Pellet wurde nun in 9 Volumina Puffer 4 gut homogenisiert und die Kerne wurden durch Ultrazentrifugation (45000 rpm, 1 h) erneut pelletiert. Mit Hilfe von Puffer 2 wurden die Kerne in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, pelletiert und standen nun für eine DNA Isolierung zur Verfügung, die wie oben beschrieben durchgeführt wurde.

2.10.7 Präparation von Phagen und von Phagen-DNA

Eine 5 ml Vorkultur lysogener *E. coli* Y1089 (2.17.2) mit dem entsprechenden lambda gt11 Phagen wurden über Nacht bei 32 °C (nicht permissive Bedingungen) unter guter Belüftung geschüttelt. 800 ml LBM wurden mit der Vorkultur angeimpft und bei 32 °C bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,6 inkubiert. Die Bildung lytischer Phagen wurde durch schnelles Erwärmen der Kultur auf 45 °C in einem 55 °C warmen Wasserbad und anschließender 15 minütiger Inkubation bei 42 °C induziert. Die Kultur wurde für weitere 3 - 4 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Bakterien durch Chloroform lysiert und die Phagen freigesetzt werden, was an einem kleinen Aliquot getestet wurde.

Vor der Lyse wurden die Bakterien pelletiert (GS3, 6000 rpm, 10 Minuten, 4 °C). Das Pellet wurde in 25 ml SM aufgenommen. Zur Freisetzung der Phagen wurden die Bakterien durch Zugabe von 10 Tropfen Chloroform und intensives Schütteln lysiert. Zur Entfernung bakterieller Nukleinsäuren wurden DNaseI und RNase bis zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterientrümmen wurden pelletiert (SS34, 12000 rpm, 15 Minuten, 4 °C) und der phagenhaltige Überstand steril filtriert. Die Phagen wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert (SW27, 25000 rpm, 2 h, 4 °C), das Pellet in 2 ml TE aufgenommen, 2 mal mit Phenol, 2 mal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 2 mal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in TE über Nacht gelöst.

2.10.8 Präparation von Phagen DNA im kleinen Maßstab (Benson, 1984)

Wurde die Phagen DNA nur in kleinen Mengen benötigt, wurden 600 µl eines Plattenlysates (2.17.1) mit 600 µl DE52 Cellulose Aufschwämmung ca. 30 mal invertiert. Dabei bindet die bakterielle DNA und RNA an den Ionenaustauscher. Das Gelmaterial wurde abzentrifugiert und aus dem Überstand wurden die Phagen durch Zugabe von 90 µl 5 M NaCl und 500 µl Isopropanol ausgefällt. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei - 20 °C wurden die Phagen pelletiert, das Pellet in 200 µl TE aufgenommen, je einmal mit Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, gefällt und die DNA schließlich in 30 µl TE aufgenommen. Für einen Restriktionsverdau wurden 5 - 10 µl der Lambda DNA eingesetzt.

2.11 ELEKTROPHORESE VON DNA

TBE

89 mM Tris
89 mM Borat
2 mM EDTA
0,25 µg/ml Ethidiumbromid

Auftragspuffer

0,25 % Bromphenolblau
50 % Glycerin
in TE

Durch Agarosegelelektrophorese können DNA Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die DNA wurde mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt und in Flachbettagarosegelen für 1 - 5 Stunden oder über Nacht bei 25 - 60 mA aufgetrennt. Für Fragmente zwischen 1 und 20 kb wurden 0,8 %ige, für Fragmente zwischen 0,3 und 8 kb 1 %ige und für kleinere Fragmente 1,5 %ige Gele verwendet. Die Gele wurden im UV Licht bei 254 nm betrachtet und fotografiert (3 sec, Blende 5,6). Als Größenmarker dienten HindIII oder HindIII/EcoRI restringierte Lambda DNA oder eine 123 bp Leiter.

2.11.1 Präparative Gelelektrophorese

Auf einem Agarosegel aufgetrennte DNA Fragmente können durch Elution aus diesem wiedergewonnen werden. Dieses Verfahren wurde eingesetzt um a) ein oder mehrere Fragmente aus einer Mischung zu isolieren oder b) um ein Fragment, wie z.B. einen geschnittenen Vektor, von nicht vollständig restringierten Fragmenten zu trennen. Die DNA wurde dabei entweder in einen Dialyseschlauch oder auf ein Ionenaustauscherpapier aus der Agarose elektroeluiert.

2.11.1.1 Elektroelution auf Ionenaustauscherpapier DE81

Waschpuffer

10 mM TrisHCl pH7,5
1 mM EDTA
100 mM LiCl

Elutionspuffer

1 M LiCl
10 mM TrisHCl pH7,5
1 mM EDTA

Dieses Verfahren war besonders erfolgreich bei geringen DNA Mengen und kleinen DNA Fragmenten (< 2 kb). Vor und hinter die gewünschte Bande im Agarosegel wurde ein Streifen DE81 Papier (DEAE-Ionenaustaucher) eingefügt und der Laufpuffer mit Fließpapier auf das Gel geleitet. Während der Elektrophorese wurde die DNA auf das DE81 Papier transferiert und dort gebunden. Das Papier wurde zunächst 2 mal mit Waschpuffer gewaschen, daraufhin erfolgte die Elution dreimal mit 150 µl Elutionspuffer (Hochsalz). Die DNA Lösung wurde phenolisiert und

präzipitiert.

2.11.1.2 Elektroelution in einen Dialyseschlauch

Dieses Verfahren wurde bei DNA Fragmenten > 2 kb, die sich nur relativ schwer von DE81 Papier eluieren lassen, und großen DNA Mengen angewandt. Das Agarosestück mit der zu eluierenden Bande wurde ausgeschnitten und mit wenig Elektrophoresepuffer in einen Dialyseschlauch überführt. Im elektrischen Feld wanderte die DNA aus dem Gel in den Puffer im Dialyseschlauch und konnte aus diesem nach Phenolisierung durch Präzipitation gewonnen werden.

2.11.2 Alkalische Agarosegelelektrophorese

Auf einem alkalischen Agarosegel wird die DNA entsprechend der Länge ihrer Einzelstränge aufgetrennt. Das Gel (1 %) wurde in 50 mM NaCl, 1 mM EDTA gegossen. Nach dem Erhärten wurde es für eine Stunde in Laufpuffer (30 mM NaOH, 1 mM EDTA) inkubiert. Die Proben wurden vor dem Laden gekocht und mit 1 M NaOH auf 50 mM NaOH eingestellt. Wurden radioaktive Proben aufgetrennt, so wurde das Gel vor der Autoradiographie für 30 Minuten in 7 % TCA fixiert und anschließend getrocknet.

2.12 TRANSFER VON DNA AUS AGAROSEGELEN AUF NITROZELLULOSE ("SOUTHERN BLOT", Southern, 1975)

Nach dem Markieren der Größenmarkerbanden im UV-Licht bei 254 nm wurde das Gel 2 x 15 Minuten in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl denaturiert, anschließend in 0,5 M TrisHCL pH7, 3 M NaCl wieder neutralisiert und 20 Minuten in 20 x SSC geschüttelt. Für den Transfer wurden auf einen in 20 x SSC getränkten Schwamm 3 Whatman 3MM Filter gelegt, darauf das Gel, die Nitrozellulose und nochmals 3 Lagen Whatman 3MM Papier. Durch saugfähige Papiertücher und Beschwerden mit ca. 500 g wurde ein Diffusionsstrom durch das Gel zur Nitrozellulose erzeugt, in dem die DNA auf die Nitrozellulose diffundierte und unter den gegebenen Salzbedingungen dort gebunden blieb. Nach einer Transferzeit von 16 - 20 Stunden wurde das Filter kurz in 3 x SSC gewaschen und 1 h bei 80 °C im Vakuum gebacken.

2.13

RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA

Zur radioaktiven Markierung von DNA wurden 2 Methoden angewandt. Durch Nicktranslation konnte die DNA innerhalb 1 Stunde mit einer spezifischen Aktivität von 2×10^8 cpm/ug markiert werden. Bei der "Random-Primer" Synthese war eine Inkubation über Nacht notwendig, jedoch konnten wesentlich höhere spezifische Aktivitäten von bis zu 2×10^9 cpm/ug erreicht werden.

2.13.1

Nicktranslation (Rigby, 1977)

4 x NT-Puffer

Nukleotidmischung

200 mM TrisHCl pH7,5

660 uM dATP

20 mM $MgCl_2$

660 uM dGTP

20 ug/ml BSA

660 uM dTTP

56 uM 2-ME

in 10 mM TrisHCl pH8

Reaktionsansatz

5 ul 4 x NT

1 ul Nukleotidmischung

1 ul DNA (25 ng)

2 ul DNA-Polymerase I

1 ul DNase (Endkonzentration 2 ng/ul)

8 ul H_2O 2 ul alpha ^{32}P -dCTP (20 uCi)

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 16 °C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden anschließend über eine Sephadex G50 Säule abgetrennt.

2.13.2 Markierung durch "Random-Primer" Synthese

Puffer

O: 125 mM TrisHCl pH8 125 mM MgCl ₂	A: 1 ml Puffer O 18 ul 2-Me je 5 ul dATP, dGTP, dTTP (100 uM)
B: 2 M Hepes pH6,6	C: Hexaribonukleotide in TE 90 ug/ml

OLB: A:B:C = 100:250:150

Reaktionsansatz	5 ul OLB 1 ul BSA 10 mg/ml 1 ul DNA (25 ng) 2 ul DNA Polymerase I, Klenow Fragment 14 ul H ₂ O 2 ul alpha- ³² P-dCTP
-----------------	---

Die DNA wurde vor der Reaktion 5 Minuten gekocht und auf Eiswasser gekühlt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe von Sephadex G 50 abgetrennt.

2.14 HYBRISIERUNG VON NITROZELLULOSEFILTERN (SOUTHERN ODER NORTHERN BLOTS UND PLAQUEHYBRIDISIERUNG)

Prähybridisierungs- lösung	Hybridisierungs- lösung
5 x SSC 1 % Sarkosyl 50 % Formamid	5 x SSC 1 % Sarkosyl 50 % Formamid 10 % Dextransulfat 5 x 10 ⁵ cpm/ml radioaktiv markierte Sonde

Die Filter wurden mindestens 1 Stunde bis maximal 20 Stunden bei 42 °C prähybridisiert. Bevor die DNA-Sonde zur Hybridisierungslösung gegeben wurde, wurde sie für 5 Minuten gekocht und anschließend auf Eis gekühlt. Die Hybridisierung erfolgte für 20 Stunden bei 42 °C. Die Filter wurden anschließend 2 x 15 Minuten mit 2 x SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und 1 x 15 Minuten mit 0,1 x SSC, 0,05 % SDS bei 68 °C gewaschen und autoradiographiert.

2.15

RE- UND SUBKLONIERUNG VON DNA FRAGMENTEN IN PLASMIDE

Um ein bestimmtes DNA Fragment zu klonieren, wurde die Ausgangs-DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, das gewünschte Fragment aufgereinigt und mit einem linearisierten, dephosphorylierten Vektorplasmid mit kompatiblen Enden ligiert. Waren Größe und/oder Enden der übrigen beim Restriktionsverdau entstandenen Fragmente derart, daß entweder nur das gewünschte Fragment ligieren oder aber später eine leichte und eindeutige Unterscheidung der Klone möglich war, entfiel die Aufreinigung des Fragmentes. Nicht kompatible Enden von Fragment und Vektor wurden mit DNA-Polymerase I, Klenow Fragment, aufgefüllt und anschließend ligiert. Kompetente *E. coli* Stämme wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und rekombinante Plasmide nach Schnellpräparation der DNA durch Restriktion und Elektrophorese identifiziert.

2.15.1

Restriktion

Die DNA wurde mit der für eine vollständige Restriktion nötigen Enzymmenge unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen restringiert.

2.15.2

Dephosphorylierung

Sollte bei späteren Versuchen die Ligation von restringierten Enden mit sich selbst unterbleiben, etwa wenn es sich um einen Klonierungsvektor handelte, so wurde die DNA nach vollständiger Restriktion noch im Restriktionsansatz mit 1 U/ug DNA alkalischer Phosphatase behandelt (20 Minuten, 37 °C). Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Einstellen des Reaktionsansatzes auf 20 mM Nitriloessigsäure und einer weiteren Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurde die DNA durch präparative Gelelektrophorese und Phenolisierung gereinigt.

2.15.3 Auffüllen von 5' überhängenden Enden

Reaktionsbedingungen

75	mM TrisHCl pH 7,6
1	mM DTT
7	mM MgCl ₂
200	uM dATP, dGTP, dCTP, dTTP
1-10	ug DNA
1	u DNA Polymerase I, Klenow Fragment

Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Phenolextraktion und Präzipitation gereinigt.

2.15.4 Ligation

10 x Ligationspuffer

660	mM Tris-HCL pH 7,5
100	mM MgCl ₂
10	mM EDTA
500	mM NaCl
10	mM ATP
100	mM 2-Mercaptoethanol

Zur Ligation wurde ein fünffacher molarer Überschuß von Fragment zu Vektor eingesetzt. DNA Fragmente mit kompatiblen, überhängenden Enden wurden zusammen mit dem Vektor erhitzt und anschließend bei 12 °C für 3 bis 12 Stunden mit 1 U/ug T4 DNA Ligase inkubiert.

Sollten nicht kompatible Enden miteinander ligiert werden, so wurden diese zuerst aufgefüllt (2.15.3), und dann für mindestens 12 Stunden ligiert.

2.15.5 Herstellung kompetenter Bakterien

50 ml LB Medium wurden mit 1 ml einer Vorkultur der entsprechenden Bakterien angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,75 - 0,8 (600 nm) unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum durchgeführt. Die Bakterien wurden für 30 Minuten in Eiswasser abgekühlt und anschließend pelletiert (SS34, 4000 rpm, 5 Minuten, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 25 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ aufgenommen und 30 Minuten auf Eiswasser inkubiert. Mit einem Aliquot wurde die Transformationseffizienz bestimmt. Zur Aufbewahrung wurden die kompetenten Bakterien mit 5

ml 50 % Glycerin versetzt, in 200 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.15.6 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmiden

Die Plasmid-DNA wurde mit H_2O auf 10 - 20 μ l verdünnt und zu 100 μ l gerade auftauenden kompetenten Bakterien pipettiert. Diese wurden 10 Minuten in Eiswasser inkubiert und anschließend 2 Minuten auf 42°C erwärmt. Nach Zugabe von 500 μ l LB Medium folgte eine 30 - 60 minütige Inkubation bei 37°C , um den Bakterien die Möglichkeit zu geben, die in der Regel auf dem Plasmid kodierte Resistenz gegen bestimmte Antibiotika zu exprimieren. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen auf antibiotikahaltige LB Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Wurden Plasmide verwendet, die das LacZ Fragment der beta-Galaktosidase enthalten (pUC19 oder bluescribe), wurden die Platten zusätzlich mit IPTG und X-Gal supplementiert, um rekombinante (weiße) und nichtrekombinante (blaue) Kolonien zu unterscheiden. Die Kolonien wurden ausgezählt und die Transformationseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA Menge bestimmt.

2.16 SEQUENZIERUNG VON DNA (Chen, 1985)

Es wurde eine Modifikation der Sequenzierungstechnik nach Sanger (1979) angewandt, die es ermöglicht, DNA Fragmente, welche in die Polylinkersequenz von pUC Vektoren kloniert sind, direkt nach der Dideoxystrangabbruchmethode zu sequenzieren. Nach Plasmidmidenaturierung wird in einer enzymatischen Reaktion ausgehend von einem 17 b Nukleotid Primer ein radioaktiv markierter DNA Strang synthetisiert. Der "uni" Primer startet die Synthese ausgehend von der EcoRI Schnittstelle des Polylinkers in den pUC Vektoren, der "reverse" Primer ausgehend von der HindIII Schnittstelle aus. Durch Zugabe eines von 4 ddNTPs kommt es zu einem statistisch verteilten Kettenabbruch hinter einem eingebauten ddNTP. Führt man diese Reaktion parallel mit allen 4 ddNTPs durch und trennt die synthetisierten Moleküle anschließend in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel auf, kann aus der Abfolge der Banden in den 4 Spuren die Basensequenz von 5' nach 3' bestimmt werden.

2.16.1 Präparation der Plasmid-DNA zum Sequenzieren

Die Methode gleicht im wesentlichen der Plasmidschnellpräparation (2.10.4), jedoch wurde besonderes Augenmerk darauf gerichtet, daß die DNA nicht "genickt" wurde, da nur die kovalent ringförmig geschlossene Plasmidform (CCC) für das Sequenzieren geeignet ist. Puffer 2 wurde stets nur frisch verwendet.

5 ml einer Übernachtskultur wurden zentrifugiert, das Bakterienpellet in 100 µl Puffer 1 resuspendiert, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 200 µl Puffer 2 versetzt, 5 Minuten vorsichtig gemischt und nach Zugabe von 150 µl Puffer 3 für 15 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden durch 15 minütige Zentrifugation pelletiert. Die DNA wurde 2 mal vorsichtig mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, mit Ethanol ausgefällt und für 15 - 30 Minuten pelletiert. Das trockene Pellet wurde in 100 µl TE gelöst, mit 1 µl RNase (10 mg/ml) versetzt und 10 Minuten bei 68 °C und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl TE wurde einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und die DNA erneut gefällt und pelletiert. Das trockene Pellet wurde in 15 - 20 µl TE gelöst und für 10 Minuten auf 68 °C erhitzt.

2.16.2 Denaturierung und Hybridisierung des Primers

10 x Sequenzierpuffer

100 mM TrisHCL pH 7,5
50 mM MgCl₂
75 mM DTT

5 µl Plasmid DNA (präpariert nach 2.16.1) wurden mit 11 µl H₂O verdünnt und mit 4 µl frisch angesetzter 1 M NaOH 5 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 2 µl 2 M Ammoniumacetat und 40 µl Ethanol gefällt und anschließend pelletiert. Das Pellet wurde 1 x in 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Für die Hybridisierung der Einzelstrang DNA mit dem Primer wurde das Pellet in 15 µl 1 x Sequenzierpuffer mit 1 pMol Primer, "reverse" oder "uni", gelöst und für 10 Minuten auf 68 °C erhitzt und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

2.16.3 Sequenzierreaktion

Lösung I

2,0 ul DNA Polymerase I, Klenow Fragment (10 U)
 2,5 ul alpha-³⁵S-dATP (650 Ci/mmol)
 1,0 ul 10 x Sequenzierpuffer
 4,5 ul H₂O

dNTP/ddNTP-Lösungen (jeweils in 1 x Sequenzierpuffer)

A-Lösung

20 uM ddATP
 37,5 uM dCTP
 37,5 uM dGTP
 37,5 uM dTTP

C-Lösung

100 uM ddCTP
 5,4 uM dCTP
 54 uM dGTP
 54 uM dTTP

G-Lösung

100 uM ddGTP
 5,4 uM dGTP
 54 uM dCTP
 54 uM dTTP

T-Lösung

450 uM ddTTP
 5,4 uM dTTP
 54 uM dCTP
 54 uM dGTP

dNTP-Chase

je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Stopppuffer

0,3 % Xylencyanol
 0,3 % Bromphenolblau
 0,37 % EDTA pH 7,0 in deionisiertem Formamid

2,2 ul Lösung I wurden für jeden Reaktionsansatz vorgelegt, 2 ul der entsprechenden dNTP/ddNTP Lösung und 3 ul DNA (2.16.2) zugegeben und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Markierte, aber nicht terminierte Stränge wurden durch Zugabe von 1,5 ul dNTP-Chase verlängert (15 Minuten, 37 °C). Nach Zugabe von 5 ul Stopppuffer wurden die Proben für 2 Minuten bei 95 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und auf ein Sequenzgel geladen oder bei - 70 °C aufbewahrt. Dieser Reaktionsansatz ist ausreichend für 3 Gele.

2.16.4 Sequenzgel

DDM-Silanlösung 5 % in Chloroform

MPT-Silanlösung 5 ml Ethanol

Zusammensetzung:	8	M Harnstoff
	6-8	% Acrylamid
	0,3-0,4	% Bisacrylamid
	0,05	% Temed
	0,1	% APS

Die in der Sequenzreaktion synthetisierten Nukleinsäuren wurden auf einem dünnen, denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, welches es ermöglicht, Größenunterschiede von einer Base zu erkennen. Um einen möglichst gleichmäßigen Bandenabstand über alle Größenbereiche zu erzielen, wurde ein keilförmiges Gel (oben 0,2 mm, nach unten 0,6 mm) verwendet. Auf diese Weise entsteht ein Feldgradient, durch den die Wanderungsgeschwindigkeit der kleineren Fragmente am unteren Ende des Geles abnimmt. Eine der Glasplatten wurde mit MPT-Silan beschichtet (20 Minuten, 80 °C). Dadurch wurde das Gel kovalent an diese Platte gebunden. Um ein Ablösen der zweiten Platte zu ermöglichen, wurde diese zur Erzeugung einer hydrophoben Oberfläche mit DDM-Silan beschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 1 Stunde und einem 30 minütigen Vorlauf wurde das Gel beladen. Banden kleiner Größe konnten ausgewertet werden, wenn das Bromphenolblau den unteren Rand des Geles erreicht hatte, zur Auswertung größerer Banden waren entsprechend längere Laufzeiten und niederprozentigere Gele nötig. Nach Entfernen der silanisierten Glasplatte wurde der Harnstoff 30 Minuten in 10 %iger Essigsäure herausgelöst, das Gel unter fließendem Wasser für 5 Minuten gespült, getrocknet und autoradiographiert.

2.17

SYNTHESE UND KLONIERUNG VON cDNA (Lapeyre, 1985)

Gesamt mRNA wurde mit Hilfe von MMLV (Moloney murine leukemia virus) Reverser Transkriptase (RT) in cDNA überschrieben, wobei Oligo dT Fragmente als Starter verwendet wurden. Die Synthese des 2. Stranges erfolgte durch das Klenow Fragment der DNA-Polymerase I. Durch Zugabe von RNase H wurde die RNA im RNA/DNA Hybrid partiell abgebaut, die entstandenen Bruchstücke dienten der Polymerase als Starter. Die entstehenden DNA Stücke wurden durch die NADP abhängige E.coli DNA Ligase miteinander verbunden. Im dritten Schritt wurden Haarnadelstrukturen durch S1 Nuklease abgebaut. Die DNA wurde an Eco RI Schnittstellen methyliert, um später eine Restriktion mit EcoRI in der cDNA zu vermeiden, und eventuell noch überstehende Enden wurden anschließend mit dem Klenow Fragment der DNA Polymerase I aufgefüllt, bevor EcoRI linker ligiert wurden. Nach Restriktion und Abtrennung der

freien Linker wurde die fertige cDNA in EcoRI restringierte lambda gt11 Arme ligiert.

Die Phagen-DNA wurde in vitro verpackt und anschließend auf E.coli Y1090 Zellen ausplattiert.

2.17.1 Oligo dT geprimete Synthese des 1. Stranges

5 x MLV-RT Puffer

250 mM TrisHCl pH 7,6

375 mM KCl

50 mM DTT

15 mM MgCl₂

Zunächst wurde der Oligo dT Primer an das Poly A Stück der mRNA durch 10 minütiges Erhitzen auf 68 °C und anschließendes Abkühlen auf Eis hybridisiert, wobei das Verhältnis von mRNA zu Primer etwa 1:1 betrug. In einem Standardansatz wurden 2 µg mRNA und 2 µg Primer in 80 µl H₂O verwendet. Die Synthese des 1. Stranges erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in folgendem Reaktionsansatz (160 µl):

80 µl mRNA mit Primer

32 µl 5 x MMLV-RT Puffer

8 µl 10 mM dATP

8 µl 10 mM dCTP

8 µl 10 mM dGTP

8 µl 10 mM dTTP

6 µl MMLV RT (200 u/ul)

10 uCi alpha-³²P-dCTP

Da MMLV RT bei 37 °C eine Halbwertszeit von ca. 20 Minuten hat, wurden nach 20 und 40 Minuten nochmals je 5 µl des Enzyms zugegeben.

Anschließend wurde die Radioaktivität in jeweils 2 µl des Ansatzes direkt und nach TCA Präzipitation bestimmt. Dazu wurden 2 µl DNA Lösung, 2 µl Kalbsthymus DNA (10 mg/ml), 50 µl TE und 30 µl 60 % TCA gemischt, die ausgefällte DNA auf ein NC-Filter aufgetragen und die auf dem Filter gebundene Radioaktivität gemessen. Aus dem Verhältnis der eingebauten zur gesamten Radioaktivität wurde die Menge an synthetisiertem 1. DNA Strang wie folgt bestimmt:

$$\frac{0,5 \times 4 \times 330 \times 160 \times \text{eingebaute cpm}}{\text{eingesetzte cpm} \times 1000} = \mu\text{g cDNA}$$

Freie Nukleotide und kleine DNA Stücke wurden durch Gelfiltration über eine Sephadex G50 Säule entfernt. Anschließend wurde die DNA einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und die Nukleinsäure mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 208 µl H₂O gelöst.

2.17.2

Synthese des zweiten Stranges

Die Synthese des zweiten Stranges erfolgte in folgendem Reaktionsansatz für 1 h bei 12 °C und 1 h bei 16 °C:

	Endkonzentration
208 ul DNA	
7,5 ul 200 mM MgCl ₂	5 mM
30 ul 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
15 ul 2 M KCl	100 mM
3 ul 10 mM dATP	100 uM
3 ul 10 mM dCTP	100 uM
3 ul 10 mM dGTP	100 uM
3 ul 10 mM dTTP	100 uM
10 ul 1mg/ml BSA	33 ug/ml
2,5 ul 20 mM NAD	166 uM
5 ul Pol I (Klenow)	25 u
2 ul RNaseH	5 u
1 ul E.coli DNA Ligase	1 ug

Die DNA wurde anschließend durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol gereinigt und mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 84,3 ul H₂O aufgenommen.

2.17.3

S1 Nuklease Verdau der Haarnadelstrukturen

Bei der Synthese des zweiten Stranges entstehen durch Zurückfalten der DNA Haarnadelstrukturen, die vor der Ligation der Linker entfernt werden müssen.

10 x S1-Puffer

300 mM Na-Acetat pH 4,6

500 mM NaCl

10 mM ZnSO_4

2 μl der DNA Lösung wurden zur Bestimmung der Radioaktivität mit TCA präzipitiert.

Reaktionsansatz

82,3 μl DNA

10 μl 10 x S1 Puffer

5,7 μl Glycerin (87 %)

2 μl S1 Nuklease (10 u/ μg DNA)

Der Reaktionsansatz wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden weitere 2 μl mit TCA präzipitiert. Die DNA wurde über eine Sephadex G50 Säule größenfraktioniert, anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, mit Ethanol gefällt und in 75 μl H_2O aufgenommen. Die TCA präzipitierbare Radioaktivität wurde vor und nach S1 Nukleasebehandlung bestimmt.

2.17.4 Methylierung von EcoRI Schnittstellen

5 x Methylierungspuffer

500	mM TrisHCl pH 8
50	mM EDTA
400	uM S-Adenosyl-Methionin
4	mg/ml BSA

Reaktionsansatz

75	ul cDNA
20	ul 5 x Methylierungspuffer
5	ul EcoRI Methylase

Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 80,5 ul H₂O aufgenommen.

2.17.5 Auffüllen überhängender Enden mit DNA Polymerase I, Klenow Fragment

Reaktionsansatz

	Endkonzentrationen
80,5 ul DNA	
5 ul 1 M TrisHCl pH 7,5	50 mM
3,5 ul 200 mM MgCl ₂	7 mM
1 ul 100 mM DTT	1 mM
2 ul 10 mM dATP	200 uM
2 ul 10 mM dCTP	200 uM
2 ul 10 mM dGTP	200 uM
2 ul 10 mM dTTP	200 uM
2 ul DNA Pol I (Klenow)	10 u

Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA phenolisiert und gefällt.

2.17.6 Ligation von EcoRI Linkern

Es wurden phosphorylierte Oligomere (12 bp) verwendet, die eine Erkennungsstelle für EcoRI enthalten. Je ug cDNA wurden 0,5 ug Linker eingesetzt und in einem Standardligationsansatz (2.15.4) über Nacht mit der cDNA verknüpft. Anschließend wurde mit EcoRI restringiert, wodurch

cDNA mit ligationsfähigen EcoRI Enden, aber auch ligationsfähige "freie" Linker entstanden. Da letztere in einem ca. 100fachen molaren Überschuß vorlagen, war eine sorgfältige Abtrennung von der cDNA nötig.

2.17.7 Abtrennung der freien Linker von der cDNA

Der Restriktionsansatz wurde mit TEN auf 100 µl aufgefüllt, und über eine Sephadex G50 Säule vorfraktioniert. Die cDNA enthaltenden Fraktionen wurden eingeengt, für 5 Minuten auf 68 °C erhitzt, mit 20 µl Gelladepuffer versetzt und auf eine Biogel A50 Säule (10 cm lang, ca. 0,6 cm Durchmesser) aufgetragen, welche in TEN äquilibriert war. Die Fließgeschwindigkeit wurde durch Variation des hydrostatischen Druckes so eingestellt, daß der blaue Farbstoff ca. 1 cm in 5 Minuten wanderte. Es wurden Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt. Der cDNA Peak wurde durch Zählen der Cerenkov Counts in den einzelnen Fraktionen ermittelt. Die Peakfraktionen wurden gepoolt, mit 2-Butanol auf etwa 0,5 ml eingeengt, einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

2.17.8 Ligation mit dem Vektor lambda gt11

Das genaue Volumen der cDNA Lösung wurde bestimmt, 10 µl mit TCA präzipitiert und aus der präzipitierbaren Radioaktivität die Menge an cDNA bestimmt. Aliquots wurden in verschiedenen, bekannten Verhältnissen mit dem Vektor lambda gt11 gemischt, präzipitiert und ligiert (2.15.4). Die Testansätze wurden in vitro in Phagenköpfe verpackt (2.17.9), ausplattiert und das beste Verhältnis von cDNA zu Vektor bestimmt. In diesem Verhältnis wurde der Rest der cDNA mit dem Vektor ligiert, verpackt und getitert. Unmittelbar darauf wurde die cDNA Bank amplifiziert, da aufgrund von Radiolyse der Phagen der Titer sonst sehr schnell abfiel.

2.17.9 In vitro Verpackung von Phagen DNA in Phagenköpfe

Es wurden käufliche Verpackungsextrakte (Promega) verwendet, da hiermit die höchsten Verpackungseffizienzen erreicht wurden. 5 µl DNA wurden vorsichtig mit 10 µl gerade aufgetautem "sonic extract" gemischt. Daraufhin wurden 15 µl "freeze-thaw" extract vorsichtig untergemischt. Der Verpackungsansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 500 µl SM verdünnt und mit 10 µl Chloroform stabilisiert.

2.17.10**Ausplattieren von Phagen auf Indikatorbakterien**

200 μ l Aliquots einer Übernachtskultur von *E. coli* Y1090 oder Y1088 in LBMM wurden mit verschiedenen Verdünnungen von lambda gt11 Phagen infiziert und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 3,5 ml verflüssigten LBM-Weichagar (45 °C) gemischt und auf LBM Platten ausplattiert. Sollten rekombinante von nicht rekombinanten lambda gt11 Phagen unterschieden werden, wurde der Weichagar mit 1 mM IPTG und 30 mg/ml X-Gal supplementiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die entstandenen Plaques am nächsten Morgen ausgezählt.

2.17.11**Herstellung von lambda gt11 Plattenlysaten**

Für Plattenlysate 1×10^6 Phagen auf 200 μ l Indikatorbakterien auf einer 10 cm-Agarplatte ausplattiert, so daß eine konfluente Lyse entstand. Die Platten wurden mit 5 ml SM überschichtet, der Überstand nach 30 Minuten abgenommen, zentrifugiert und steril filtriert.

2.17.12**Herstellung lysogener, lambda gt11 haltiger Bakterien**

Flüssiglysate von Lambda gt11 können durch Induktion lysogener Bakterienstämme hergestellt werden. Um diese zu gewinnen, wurden 3 μ l einer frischen Übernachtskultur des *E. coli* Stammes Y1089 mit 1×10^{10} Phagen infiziert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 ml LBM wurde 1 μ l ausplattiert und über Nacht bei 32 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden auf jeweils 2 Platten übertragen, eine wurde bei 42 °C (permissive Temperatur) und eine bei 32 °C (nicht permissive Temperatur) inkubiert. Kolonien, welche bei 32 °C, nicht aber bei 42 °C wachsen, sind lysogen und tragen den Prophagen im Genom.

Mit den lysogenen Bakterien wurden Flüssigkulturen angeimpft und nach Induktion des lytischen Zyklus der Phagen durch Zugabe von Chloroform zur Lyse gebracht werden.

2.18

IDENTIFIZIERUNG SPEZIFISCHER CDNA KLONE

2.18.1

Identifizierung von cDNA Klonen mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

1×10^5 Phagen wurden auf eine Agarplatte von 20 x 20 cm auf 3,5 ml einer frischen Übernachtskultur von *E.coli* Y1090r⁻ ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zwei Nitrozellulosefilter entsprechender Größe wurden übereinander auf die Platte gelegt und 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, um die DNA an die Filter zu binden. Die Position der Filter wurde durch Nadelstiche auf der Platte markiert, die Filter abgezogen und für je 10 Minuten auf einem getränkten Whatmann 3MM Filter denaturiert (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und zweimal neutralisiert (3 M NaCl, 0,5 M TrisHCl, pH 7). Die Filter wurden 2 Minuten in 5 x SSC gewaschen und anschließend 1 Stunde bei 80 °C im Vakuum gebacken. Die Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten wie bei Southern Filtern (2.12), wobei zur Minimierung des unspezifischen Hintergrundes die Prähybridisierungszeit auf 20 Stunden verlängert und der Puffer dreimal gewechselt wurde. Es wurden nur solche Plaques als positiv angesehen, welche auf beiden Filtern Signale hervorriefen. Diese wurden gepickt und durch mehrmaliges erneutes Ausplattieren und Hybridisieren gereinigt.

2.18.2

Screening der cDNA Bank mit Antikörpern

1×10^5 Phagen wurden auf einer 20 x 20 cm großen Agarplatte auf 3,5 ml einer frischen Übernachtskultur von *E.coli* Y1090r⁻ ausplattiert und für 3 Stunden bei 42 °C inkubiert, bis kleine Plaques sichtbar wurden. Unter diesen Bedingungen findet keine Expression der klonierten Sequenzen statt, so daß auch Phagen, die für toxische Proteine kodieren, wachsen. Da für einen Immunblot eine Expression der klonierten Sequenzen nötig ist, wurde ein Nitrozellulosefilter aufgelegt, welches zuvor in 10 mM IPTG getränkt und getrocknet worden war, und die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Position des Filters auf der Platte durch Nadelstiche markiert, das Filter abgenommen und 3 x in TBST gewaschen. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden mit 20 % FCS in TBST abgesättigt. Die Antikörperreaktion erfolgt wie beim Western Blot (2.5.1), mit der Ausnahme, daß allen Lösungen 5 % FCS zur Reduzierung des Hintergrundes zugesetzt wurde.

2.19

IN VITRO EXPRESSION KLONIERTEN CDNA

Der "Bluescribe"-Vektor enthält die Promotorsequenzen für SP6- und T7-Polymerase 5' bzw. 3' der Polylinker-Sequenz. Nach Subklonierung der cDNA in diesen Vektor und Bestimmung der Orientierung kann mit SP6- oder T7-Polymerase eine "sense" oder "antisense" RNA in vitro synthetisiert werden. Diese kann dann mit Hilfe eines Retikulozytenlysates in vitro in das entsprechende Protein translatiert werden.

2.19.1

In vitro Transkription

Die in "Bluescribe" reklonierte cDNA konnte mit Hilfe von T7 Polymerase in eine "sense" mRNA transkribiert werden. Da keine Transkriptionsterminationssignale vorhanden waren, wurde das Plasmid 3' der cDNA Sequenz geschnitten und dadurch linearisiert.

5 x Transkriptionspuffer

200	mM Tris HCl pH 7,5
30	mM MgCl ₂
10	mM Spermidin
50	mM NaCl

Reaktionsansatz

7,7	ul H ₂ O
4,0	ul 5 x Transkriptionspuffer
2,0	ul DTT
0,8	ul RNasin
4,0	ul 2,5 mM rATP, rGTP, rCTP und rGTP
1,0	ul DNA (0,5 ug)
0,5	ul T7-RNA Polymerase (15 U)

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1 U/ul DNase I und 15 minütige Inkubation bei 37 °C entfernt und die RNA durch Phenolisierung und Ethanolpräzipitation gereinigt. Das RNA Pellet wurde in 10 ul H₂O aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

2.19.2

In vitro Translation

Translationsansatz

35	ul Retikulozytenlysat
5	ul H ₂ O
1	ul Aminosäuremischung ohne Methionin, 1 mM
2	ul RNAsin (50 U)
2	ul RNA (1 ug)
5	ul ³⁵ S-Methionin

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 30 °C inkubiert. 20 ul der Ansatzes wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel (2.4.4) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und autoradiographiert.

- Adamson ED, 1987: Oncogenes in development. *Development* 99: 449 - 471
- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB, 1979: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282: 615
- Albin C, Robinson WS, 1981: Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J. Virol.* 34: 297 - 302
- Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW, Lecatsas G, 1976: Establishment of a continously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S. Afr. J. Med.* 50: 2124 - 2128
- Alexander JJ, 1984: In vitro studies of human hepatocellular carcinoma cell lines. in: *Advances in hepatitis research*, Chisari SV ed., Masson Publishing.
- An G, Friesen JD, 1980: *Gene* 12: 33 - 39
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon ICM, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG, 1981: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457 - 465
- Auffray CH, Roujeau F, 1980: Purification of mouse immunoglobulin messenger RNAs from myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.* 107: 303 - 314
- Aviv H, Leder P, 1972: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408
- Balcavage WX, Baxter-Gabbard KL, Ko M, Rea M, Padgett F, Levine AS, 1972: Mitochondrial alterations associated with Avian Reticuloendotheliosis Virus (Strain T) Pathogenicity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48: 605 - 611
- Bavand RM, Laub O, 1988: Two Proteins with Reverse Transcriptase Activities Associated with Hepatitis B Virus-Like Particles. *J. Virol.* 62: 626 - 628
- Beasley RP, 1982: Hepatitis B virus as the agent in hepatocellular carcinoma: epidemiological considerations. *Hepatology* 2: 21 - 26
- Beasley RP, Hwang LY, 1984: Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH eds, Grune & Stratton, New York: 209 - 214
- Benson SA, Taylor RKI, 1984: A Rapid Small-Scale Procedure for Isolation of Phage lambda DNA. *BioTechniques*:127
- Birnboim HC, Doly J, 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 7: 1513 - 1523
- Bishop M, 1985: Viral oncogenes. *Cell* 42: 23 - 28
- Blum HE, Stowing L, Figus A, Montgomery CR, Haase AT, Vyas GN, 1983: Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocytes, bile duct epithelium and vascular elements by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80: 6685 - 6688
- Bollag W, 1972: Prophylaxis of chemically induced benign and malignant epithelial tumors by vitamin A acid (retinoic acid). *Eur. J. Cancer* 8: 689 - 693
- Broome S, Gilbert W, 1985: Rous sarcoma virus encodes a transcriptional activator. *Cell* 40: 537 - 546

- Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P, 1980: Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* 286: 533 - 535
- Brechot C, Lugassy C, Dejean A, Pontisso P, Thiers V, Berthelot P, Tiollais P, 1984: Hepatitis B virus DNA in infected human liver tissues. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Vyas GN, Dienstag JL, Hoofmagle JH eds, New York: 395 - 409
- Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ, 1980: Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2936 - 2940
- Brooks SC, Locke ER, Soule HD, 1973: Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) from Breast Carcinoma. *J. Biol. Chem.* 248: 6251- 6253
- Brown JP, Hewick RM, Hellström I, Hellström KE, Doolittle RF, Dreyer WJ, 1982: Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin. *Nature* 296: 171 - 173
- Buetow DE, Wood WM, 1978: The mitochondrial translation system. *Subcell. Biochem.* 5: 1 - 85
- Carlson RI, Ben-Porath E, Shouval D, Strauss W, Isselbacher KJ, Wands JR, 1985: Antigenic Characterization of Human Hepatocellular Carcinoma. *J. Clin. Invest.* 76: 40 - 51
- Cattaneo R, Will H, Hernandez N, Schaller H, 1983: Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* 305: 336 - 338
- Cattaneo R, Will H, Schaller H, 1984: Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J.* 3: 2191 - 2196
- Caveane WK, Hansen MF, Nordenskjold M, Kock E, Maumenee I, 1985: Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science* 228: 501 - 503
- Chakraborty PR, Ruiz-Opazo N, Shouval D, Shafritz DA, 1980: Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in an HBsAg-producing human hepatocellular carcinoma cell line. *Nature* 286, 531 - 533
- Chan KH, Yip TX, Ng WL, Ng MH, 1985: A shared antigenic determinant between human B lymphocytes and carcinomas (BLCa). *Int. J. Cancer* 36: 329 - 336
- Chang DD, Fisher RP, Clayton DA, 1987: Roles for a promotor and RNA processing in the synthesis of mitochondrial displacement-loop strands. *Bioch. Biophys. Acta* 909: 85 - 91
- Chang RS, 1954: Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 87: 440 - 443
- Chang HK, Chou CK, Chang C, Su TS, Hu CP, Yohida M, Ting LP, 1987: The enhancer sequence of human hepatitis B virus can enhance the activity of its surface gene promotor. *Nucl. Acids. Res.* 15: 2261 - 2268
- Chen EJ, Seeburg PH, 1985: Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4: 165 - 170
- Chen HL, Ai ZW, Zha XL, Choy PC, 1988: Effects of retinoic acid on human hepatocarcinoma cell line. *FASEB Journal* 2: A1020
- Chen J-Y, Hsu H-C, Lee C-S, Chen D-S, Zuckerman AJ, Harrison TJ, 1988: Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma: methylation of integrated viral DNA. *J. Virol. Meth.* 19: 257 - 263

- Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MWJ, Ragan CI, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y, Doolittle RF, Attardi G, 1985: Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* 314, 592 - 597
- Chou H-W, Harrel D, Forough R, Watabe K, 1988: Binding of tissue-specific factors to the enhancer sequence of hepatitis B virus. *FEBS Letters* 229: 349 - 354
- Colbere-Garapin F, Chousterman S, Horoniceau F, Kourilsky P, Garapin AC, 1979: Cloning of the active thymidine kinase gene of Herpes Simplex Virus type I in *E. coli* K 12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3755 - 3759
- Coppard NJ, Cramer F, Clark BFC, 1982: Identification of elongation factor 1-alpha from mouse liver. *FEBS letters* 145: 332 - 336
- Coppard NJ, Calrk BFC, Cramer F, 1983: Methylation of elongation factor 1-alpha in mouse 3T3B and 3T3B/SV40 cells. *FEBS letters* 164: 330 - 334
- Crick F, 1979: Split Genes and RNA Splicing. *Science* 204, 264 - 271
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M, 1970: Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. *Lancet* 1: 695
- Debelka U, 1988: Analyse einer integrierten, transaktivierenden Hepatitis B Virus Sequenz. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Julius Maximilians Universität Würzburg.
- Dejean A, Lugassi C, Tiollais P, Brechot C, 1984a: Detection of hepatitis B virus DNA in pancreas, kidney and skin of two human carriers of the virus. *J. Gen. Virol.* 65: 651 - 655
- Dejean A, Sonigo P, Wain-Hobson S, Tiollais P, 1984b: Specific hepatitis B virus DNA integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5350 - 5354
- Dejean A, Bougueleret L, Grzeschik KH, Tiollais P, 1986: Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to *c-myc* and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 322: 70 - 72
- De-Medina T, Faktor O, Shaul Y, 1988: The S Promotor of Hepatitis B Virus is Regulated by Positive and Negative Elements. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2449 - 2455
- Devreux J, Haeblerli P, Smithies O, 1984: A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids. Res.* 12: 387 - 395
- Duelli J, 1988: Untersuchung von Cis- und Trans-Effekten einer klonierten, chromosomal integrierten Hepatitis B Virus DNA Sequenz. Diss. der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Edman CE, Gray P, Valenzuela P, Rall LB, Rutter WJ, 1980: Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. *Nature* 286, 535 - 538
- Eisenburg J, 1982: Die Virus-induzierten Lebererkrankungen beim Menschen. *Naturwissenschaften* 69: 585 - 593
- Elfassi E, Romet-Lemonne JL, Essex M, France-Mclane M, Haseltine WA, 1984 Evidence of extrachromosomal forms of hepatitis B viral DNA in a bone marrow culture obtained from a patient recently infected with Hepatitis B Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3526 - 3528
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Glivov D, Oren M, 1985: Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312: 646 - 649

El Kareh A, Murphy ATM, Fichter T, Efstratiadis A, Silverstein S, 1985: Transactivation control signals in the promoter of the herpesvirus thymidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1002 - 1006

Favorolo J, Treisman R, Kamen R, 1980: Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping. *Methods Enzymol.* 65: 718

Feinberg AP, Vogelstein B, 1980: A Technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6 - 13

Feitelson MA, Millman I, Halbherr H, Simmons H, Blumberg BS, 1985: A newly identified hepatitis B type virus in tree squirrels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2233 - 2237

Fowler MJF, Thomas HC, Monjardino J, 1986: Cloning and Analysis of Integrated Hepatitis B Virus DNA of the adr Subtype derived from a Human Primary Liver Cell Carcinoma. *J. gen. Virol.* 67: 771 - 775

Freytag von Loringhoven A, Koch S, Hofschneider PH, Koshy R, 1985: Co-transcribed 3' host sequences augment expression of integrated hepatitis B virus DNA. *Embo* 4:249 - 255

Fukuda M, Wakasugi S, Tsuzuki T, Nomiya H, Shimada K, Miyata T, 1985: Mitochondrial DNA-like Sequences in the Human Nuclear Genome. *J. Mol. Biol.* 186: 257 - 266

Ganem D, Varmus HE, 1987: The molecular biology of the hepatitis B virus. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 651 - 693.

Gerlich WH, Robinson WS, 1980: Hepatitis B virus contains a protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21: 801 - 809

Gey Go, Coffman WD, Kubicek MT, 1952; *Cancer Res.* 12: 264

Hadler HI, 1974: Carcinogenesis, oxidative phosphorylation and mitochondria. *Medikon Int.* 30-6: 22 - 26

Hansen MF, Koufos A, Gallie B, Philips RA, Fodstad O, 1985: Osteosarkoma and retinoblasoma: a shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6216 - 6220

Harisiadis L, Miller RC, Hall EJ, Borek C, 1978: A vitamin A analogue inhibits radiation-induced oncogenic transformation. *Nature* 274, 486 - 487

Hayward WS, Neel GB, Astrin SM, 1981: Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* 290: 475 - 480

Hemert FJ, Amons R, Pluijms WJM, Ormondt H, Möller W, 1984: The primary structure of elongation factor EF-1alpha from the brine shrimp *Artemia*. *Embo* 3: 1109 - 1113

Hess JL, Clements JE, Narayan O, 1985: Cis and transacting transcriptional regulation of visna virus. *Science* 229: 482- - 485

Heukeshoven J, Dernick R, 1985: Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamid gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6:103 - 112

Hino O, Shows TB, Rogler CE, 1986: Hepatitis B virus integration site in hepatocellular carcinoma at chromosome 17;18 translocation. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 83: 8338 - 8342

Hovemann B, Richter S, Walldorf U, Cziepluch C, 1988: Two genes encode related cytoplasmic elongation factors I-alpha in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. *Nucl. Acids Res.* 16: 3175 - 3194

Hu, C-P, Han S-H, Lui W-Y, Hsu H-C, Lin Y-M, Lin P-H, Chen L-R, Hsieh H-G, Kuo P-T, P'Eng F-K, Chang C, 1986: Monoclonal Antibodies against Antigens Expressed on Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Hepatology* 6: 1396 - 1402

Huh N, Utakoji, T, 1981: Production of HBs antigen by two new human hepatoma cell lines and its enhancement by dexamethasone. *Gann* 72: 178 - 179

Imazeki F, Yaginuma K, Omata M, Okuda K, Kobayashi M, Koike K, 1987: RNA Transcripts of Hepatitis B Virus in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 7: 753 - 757

Jenkins JR, Rudge D, Currie GA, 1984: Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312: 651 - 654

Kam W, Rall L, Schmid R, 1982: State of Hepatitis B virus in carriers, in acute infection, and in Hepatocellular carcinoma. In: *Viral Hepatitis*, Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE eds, Philadelphia, Franklin Institute Press: 809

Kan-Mitchell, J, Imam A, Kempf RA, Taylor CR, Mitchell MS, 1986: Human Monoclonal Antibodies Directed against Melanoma Tumor-associated Antigens. *Cancer Res.* 46: 2490 - 2496

Kára J, Mach O, Cerná H, 1971: Replication of Rous Sarcoma Virus and the biosynthesis of the oncogenic subviral ribonucleoprotein particles ("Virosomes") in the mitochondria isolated from rous sarcoma tissue. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44: 162 - 170

Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K, 1979: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123

Knowles BB, Howe CC, Aden DP, 1980: Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen. *Science* 209: 497 - 499

Koch S (a), Freytag von Loringhoven A, Kahmann R, Hofschneider PH, Koshy R, 1984: The genetic organization of integrated hepatitis B virus DNA in the human hepatoma cell line PLC/PRF/5. *Nucl. Acids. Res.* 12:6871 - 6886

Koch S (b), Freytag von Loringhoven A, Hofschneider PH, Koshy R, 1984: Amplification and rearrangement in hepatoma cell DNA associated with integrated hepatitis B virus DNA. *Embo* 3:2185 - 2189

Kodama H, Amagai Y, Sudo H, Kasai S, Yamamoto S, 1981: Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jap. J. Oral iol.* 23, 899 - 901

Koike K, Kobayashi M, Mizusawa H, Yoshida E, Yaginuma Y, Taira M, 1983: Rearrangement of the hepatitis B surface antigen of hepatitis B virus integrated in the human hepatoma cell lines. *Nucl. Acids Res.* 11: 5391 - 5402

Köhler G, Milstein C, 1976: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6:511

Koprowski H, Herlyn M, 1985: Human Tumor Antigens. *Progress in Cancer Research and Therapy* 32: 123 - 138

Koshy R, Hofschneider PH, 1981: Presence of hepatitis B DNA sequences integrated in the DNA of hepatocarcinoma and cirrhosis tissues. *Hepatitis B Vaccine, INSERM Symposium No. 18*, Maupas P, Guesry P eds, Elsevier: 203 - 212

- Koshy R, Koch S, Freytag von Loringhoven A, Kahmann R, Murray K, Hofschneider PH, 1983: Integration of Hepatitis B Virus DNA: Evidence for Integration in the Single-Stranded Gap. *Cell* 34: 215 - 233
- Kristensen T, Prydz H, 1986: The presence of intact mitochondrial DNA in HeLa cell nuclei. *Nucl. Acids Res.* 14, 2597 - 2609
- Laemmli UK, 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680 - 685
- Lapeyre B, Almaric F, 1985: A powerful method for the preparation of cDNA libraries: isolation of cDNA encoding a 100-kD nuclear protein. *Gene* 37:215 - 220
- Lockett TL, Sleigh MJ, 1987: Oncogenes Expression in Differentiating F9 Mouse Embryonal Carcinoma Cells. *Exp. Cell Res.* 173: 370 - 378
- Lunger PD, Clark HF, 1973: Ultrastructural Studies of Cell-Virus Interaction in Reptilian Cell Lines. I. Intramitochondrial Viruses in "C-Type" Virus-Producing VSW Cells. *J. Natl. Canc. Inst.* 50: 111 - 115
- Lusky M, Botchan MR, 1985: Genetic analyses of bovine papilloma virus type I transacting regulating factors. *J. Virol.* 53: 955 - 965
- Machida A, Kishimoto S, Ohnuma H, Baba K, Ito Y, Miyamoto H, Funatsu G, Oda K, Usuda S, Togami S, Nakamura T, Miyakawa Y, Mayumi M, 1984: A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* 86: 910
- Marion PL, Salazar FH, Alexander JJ, Robinson WS, 1979: Polypeptides of hepatitis B virus surface antigen produced by a hepatoma cell line. *J. Virol.* 32: 796 - 802
- Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullar GH, Robinson WS, 1980: A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2941 - 2945
- Mason WS, Seal G, Summers J, 1980: Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 36: 829 - 836
- McMaster GK, Carmichael GG, 1977: Analysis of single and double stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci* 74:4835
- Merriman RL, Bertram JS, 1979: Reversible Inhibition by Retinoids of 3-Methylcholanthrene-induced Neoplastic transformation in C3H/10T 1/2 Clone 8 Cells. *Cancer Res.* 39, 1661 - 1666
- Meyer M, 1988: Transaktivierung eines Indikatorgens durch genomisch integrierte Hepatitis B Virus DNA aus humanem Hepatongewebe. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth.
- Mier JW, Gallo RC, 1980: Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6134 - 6138
- Miller RH, Robinson WS, 1984: Hepatitis B virus DNA forms in nuclear and cytoplasmic fractions of infected human liver. *Virology* 137: 390 - 399
- Miller RH, 1987: Proteolytic self-cleavage of HBV core protein may generate serum e antigen. *Science* 236: 722 - 725

- Mizusawa H, Taira M, Yaginuma K, Kobayashi M, Yoshida E, Koike K, 1985: Inversely repeating integrated hepatitis B virus DNA and cellular flanking sequences in human hepatoma-derived cell line huSP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 208 - 212
- Moldave K, Harris J, Sabo W, Sadnik I, 1979: Protein Synthesis and Aging: Studies with cell-free mammalian Systems. *Fed. Proc.* 38: 1979 - 1983
- Moldave K, 1985: Eukaryotic Protein Synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1109 - 1149
- Montandon PE, Stutz E, 1983: *Nucl. Acids Res.* 11: 5877 - 5892
- Möröy T, Marchio A, Etienne J, Trépo C, Tiollais P, Buendia M-A, 1986: Rearrangement and enhanced expression of c-myc in hepatocellular carcinoma of hepatitis virus infected woodchucks. *Nature* 324: 276 - 279
- Moon RC, Grubbs CJ, Sporn MB, Goodman DG, 1977: Retinyl acetate inhibits mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosurea. *Nature* 267, 620 - 621
- Müller R, 1983: Differential expression of cellular oncogenes during murine development and in teratocarcinoma cell lines. *Cold Spring Harbor Conferences on cell Proliferation* 10: 451 - 468
- Nagashima K, Kasai M, Nagata S, Kaziro Y, 1986: Structure of the two genes coding for polypeptide chain elongation factor 1 alpha from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 45: 265 - 273
- Nagata S, Tsunetsugu-Yokota Y, Naito A, Kaziro Y, 1983: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6192 - 6196
- Nagaya T, Nakamura T, Tokino T, Tsurimoto T, Imai M, Mayumi T, Kamino K, Yamamura K, Matsubara K, 1987: The mode of hepatitis B virus integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Genes & Development* 1: 773 - 782
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J, 1982: Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Res.* 42:3858 - 3863
- Nerenberg M, Hinrichs SH, Reynolds RK, Khoury G, Jay G, 1987: The tat Gene of Human T-Lymphotropic Virus Type I Induces Mesenchymal Tumors in Transgenic Mice. *Scien* 237: 1324 - 1329
- Nomiyama H, Fukuda M, Wakasugi S, Tsuzuki T, Shimada K, 1985: Molecular structures of mitochondrial-DNA-like sequences in human nuclear DNA. *Nucl. Acids Res.* 13: 1649 - 1658
- Nomiyama H, Tsuzuki T, Wakasugi S, Fukuda M, Shimada K, 1984: Interruption of a human nuclear sequences homologous to mitochondrial DNA by a member of the KPNI 1.8 kb family. *Nucl. Acids Res.* 12: 5225 - 5234
- Nusse R, Varmus HE, 1982: Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31: 99 - 109
- Ochiya T, Fujiyama A, Fukushima S, Hatada I, Matsubara K, 1986: Molecular cloning of an oncogene from a human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 83: 4993 - 4997
- Old LJ, 1981: Cancer Immunology: The Search for Specificity. *Cancer Res.* 41: 361 - 375
- Ono Y, Ondo H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y, Nishioka K, 1983: The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucl. Acids Res.* 11: 1747 - 1757
- Oren M, Bienz B, Givol D, Rechavi G, Zakut R, 1983: *EMBO J.* 2: 1633 - 1639

- Orkin SH, Goldman DS, Sallan SE, 1984: Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumour. *Nature* 309: 172 - 174
- Osiewicz HD, Esser K, 1984: The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: A mobile intron of a mitochondrial gene. *Current Genetic* 8: 299 - 305
- Ou JH, Rutter WJ, 1985: Hybrid hepatitis B virus-host transcripts in a human hepatoma cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 83 - 87
- Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, MacKay P, Leadbetter G, Murray K, 1979: Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* 282: 575 - 579
- Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V, 1984: Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 321: 649 - 651
- Patzner E, Nakamura G, Simonsen C, Levinson A, Brands R, 1986: Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 58: 884 - 893
- Pedersen PL, 1978: Tumor Mitochondria and the Bioenergetics of Cancer Cells. *Prog. exp. Tumor Res.* 22: 190 - 274
- Perucho M, Goldfarb M, Shimizu K, Lama C, Fogh J, Wigler M, 1981: Human Tumor Derived Cell Lines Contain Common and Different Transforming Genes: *Cell* 27: 467 - 476
- Pignatelli M, Waters J, Lever A, Iwarson, Gerety R, Thomas HC, 1987: Cytotoxic T-cell response to the nucleocapsid proteins of HBV in chronic hepatitis. Evidence that antibody modulation may cause protracted infection. *J. Hepatology* 4: 15 - 21
- Popper H, Shafritz DA, Hoofnagle JH, 1987: Relation of the Hepatitis B Virus Carrier State to Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 7: 764 - 772
- Pourcel C, Louise A, Gerraiss M, Cheuciner N, Dubois MF, Tiollais P, 1982: Transcription of the hepatitis B surface antigen in mouse cells transformed with cloned viral DNA. *J. Virol.* 42: 100 - 105
- Rall LB, Standing DN, Laub O, Rutter WJ, 1983: Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 3: 1766 - 1773
- Reisfeld RA, Cheresch DA, 1987: Human Tumor Antigens. *Advances in Immunology* 40: 322 - 377
- Renner I, 1988: Dissertation an der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Richert NJ, Hare JD, 1972: Distinctive effects of inhibitors of mitochondrial function on Rous Sarcoma Virus replication and malignant transformation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46: 5 - 10
- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P, 1977 Labelling Deoxyribonucleic Acid to High Specific Activity in Vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237 - 251
- Rose TM, Plowman GD, Teplew DB, Dreyer WJ, Hellström KE, Brown JP, 1986: Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 83: 1261 - 1265
- Roth WK, Werner S, Risau W, Remberger K, Hofschneider PH, 1988: Aids related Kaposi's Sarcoma derived cell cultured express endothelial cell markers and reveal low-malignant growth properties in vitro. *International Journal of Cancer*, submitted
- Rotter V, Wolf, D, 1985: Biology and molecular analysis of p53 cellular-encoded tumor antigen. *Adv. Cancer Res.* 43: 113 - 141

- Ruiz-Opazo N, Chakarborty PR, Shafritz DA, 1982: Evidence for supercoiled hepatitis B virus DNA in chimpanzee liver and serum Dane particles: possible implications in persistent HBV infection. *Cell* 29: 129 - 138
- Ruscetti FW, Gallo RC, 1971: Human T-Lymphocyte Groth factor: Regulation of Growth and Function of T Lymphocytes. *Blood* 57: 379 - 394
- Rustgiv K, Hoofnagle JH, Masur HC, 1984: Hepatitis B virus markers in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology* 86: 1226
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, 1979: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74: 5463 - 5467
- Sassone-Corsi P, Wildman A, Chambon P, 1985: A transacting factor is responsible for the simian virus 40 enhancer activity in vitro. *Nature* 313: 458 - 463
- Schaffner W, Weissmann C, 1983: A Rapid, Sensitive and Specific Method for the Determination of Protein in Dilute Solution. *Anal. Biochem.* 56:502 - 514
- Schmidt J, Erfle V, Pedersen FS, Röhmer H, Sh<chatters H, Marquart K-H, Luz A, 1984: Oncogenic Retrovirus from Spontaneous Murine Osteosarcomas. I. Isolation and Biological Characterization. *J. gen. Virol.* 65: 2237 - 2248
- Sells MA, Chen M-L, Acs G, 1987: Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1005 - 1009
- Shaul Y, Ziemer M, Garcia PD, Crawford R, Hsu H, Valenzuela P, Rutter WJ, 1984: Cloning and Analysis of Integrated Hepatitis Virus Sequences from a Human Hepatoma Cell Line. *J. Virol.* 51: 776 - 787
- Shaul Y, Rutter WJ, Laub O, 1985: A human hepatitis B viral enhancer element. *EMBO J.* 4: 427 - 430
- Shaul Y, Ben-Levy R, De-Medina T, 1986: High affinity binding site for nuclear factor I next to hepatitis B virus S gene promoter. *EMBO J.* 5: 1967 - 1971
- Shouval D, Eilat D, Carlson RI, Adler R, Livni N, Wands JR, 1985: Human Hepatoma-Associated Cell Surface Antigen: Identification and Characterization by Means of Monoclonal Antibodies. *Hepatology* 5: 347 - 356
- Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J, 1987: Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2513 - 2517
- Sodrosky E, Rosen CA, Haseltine WA, 1984: Transacting transcriptional activation of the long terminal repeat (LTR) of human T lymphotropic virus in the infected cells. *Science* 225: 381 - 385
- Southern EM, 1975: Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol* 98: 503 - 517
- Sprengel R, Kaleta E, Will H, 1988: Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in Herons. *J. Virol.* submitted
- Stein R, Ziff EB, 1984: HeLa cell beta-tubulin gene transcription is stimulated by adenovirus 5 in parallel with viral early genes by an E1a-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2792 - 2801
- Stemler M, Jess J, Braun R, Will H, Schröder CH, 1988: Serological Evidence for Expression of the Polymerase Gene of Human Hepatitis B Virus in vivo. *J. gen. Virol.* 69: 689 - 693

- Su TS, Lin LH, Chou CK, Chand C, Ting LP, Hu CP, Han SH, 1986: Hepatitis B virus transcripts in a human hepatoma cell line, Hep 3B. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 138, 131 - 138
- Summers J, Smolec J, Snyder R, 1978: A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4533 - 4537
- Summers J, 1982: The recently described animal virus models for human hepatitis B virus. *Hepatology* 1: 179 - 183
- Summers J, 1988: The Replication Cycle of Hepatitis B Viruses. *Cancer* 61: 1957 - 1962
- Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JI, Essex M, 1986: Production of hepatitis B virus by a differentiated hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 47: 37 - 47
- Szmunn W, 1978: Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol.* 24: 40 - 69
- Tiollais P, Charnay P, Vyas GN, 1981: Biology of hepatitis B virus. *Science* 213: 406 - 411
- Toh H, Hyashida H, Miyata T, 1983: Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerase of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature* 305: 827 - 829
- Tognoni A, Cattaneo R, Serfling E, Schaffner W, 1985: A novel expression selection approach allows precise mapping of the hepatitis B virus enhancer. *Nucl. Acids Res.* 13: 7457 - 7472
- Tokino T, Fukushima S, Nakamura T, Nagaya T, Murotsu T, Shiga K, Aoki N, Matsubara K, 1987: Chromosomal translocation and inverted duplication associated with integrated hepatitis B virus in hepatocellular carcinomas. *J. Virol.* 61: 3848 - 3854
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J, 1979: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350 - 4354
- Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K, 1987: Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 444 - 448
- Tsuzuki T, Nomiya H, Setoyama C, Maeda S, Shimada K, 1983: Presence of mitochondrial-DNA-like sequences in the human nuclear DNA. *Gene* 25: 223 - 229
- Tur-Kaspa J, Burk RD, Shaul Y, Shafritz DA, 1986: Hepatitis B virus contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1627 - 1631
- Twist EM, Clark HF, Aden DP, Knowles BB, Plotkin SA, 1981: Integration Pattern of Hepatitis B Virus DNA Sequences in Human Hepatoma Cell Lines. *J. Virol.* 37: 239 - 243
- Uchida T, Suzuki K, Esumi M, Arii M, Shikata T, 1988: Influence of Aflatoxin B₁ Intoxication on Duck Livers with Duck Hepatitis B Virus Infection. *Cancer Res.* 48: 1559 - 1565
- Valenzuela P, Quiroga M, Zaldivar J, Gray P, Rutter WJ, 1980: The nucleotide sequence of hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. In: Field BN, Jaenisch R, Forx CF (eds), *Animal Virus Genetics*, Academic Press, New York, 57 - 70.
- Wakasugi S, Nomiya H, Fukuda M, Tsuzuki T, Shimada K, 1985: Insertion of a long KpnI family member within a mitochondrial-DNA-like sequence present in the human nuclear genome. *Gene* 36: 281 - 288
- Wiedmann KH, Trejdosiewicz LK, Southgate J, Thomas HC, 1987: Human Hepatocellular Carcinoma: Cross-Reactive and Idiotypic Antigens Associated with Malignant Transformation of Epithelial Cells. *Hepatology* 7: 543 - 550

Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Büscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H, 1987: Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* 61: 904 - 911

Wilson B, Ozturk M, Takahashi H, Motté P, Kew M, Isselbacher KJ, Wands JR, 1988: Cell-surface changes associated with transformation of human hepatocytes to the malignant phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3140 - 3144

Wolf H, 1986: Virus-assoziierte Krebserkrankungen des Menschen. *Münch. med. Wschr.* 128: 634 - 638

Wollersheim M, 1987: Eine bisher unbekannte Funktion des HBx-Proteins: Transaktivierung als potentieller Mechanismus der Hepatitis B Virus assoziierten Onkogenese. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Wollersheim M, Hofschneider PH, 1988: Transactivation by a product of the X gene of hepatitis B virus. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Liss AR ed, Inc.

Wollersheim M, Debelka U, Hofschneider PH, 1988: A transactivating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state. *Oncogene*, in press

Wright RM, Cummings DJ, 1983: Integration of mitochondrial gene sequences within the nuclear genome during senescence in a fungus. *Nature* 302: 86 -88

Yagita H, Masuko T, Hashimoto Y, 1986: Inhibition of Tumor Cell Growth in Vitro by Murine Monoclonal Antibodies That Recognize a Proliferation-associated Cell Surface Antigen System in Rats and Humans. *Cancer Res.* 46: 1478 - 1484

Yanisch-Perron, C, Vieira J, Messing J, 1985: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp8 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103 - 109

Young RA, Davis RW, 1983: Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1194 - 1198

Zahn P, Hofschneider PH, Koshy R, 1988: The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene*, submitted

Ziemer M, Garcia P, Shaul Y, Rutter WJ, 1985: Sequence of Hepatitis B Virus DNA Incorporated into the Genome of a Human Hepatoma Cell Line. *J. Virol.* 53: 885 - 892

G

ABKÜRZUNGEN

ABTS	2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazolinsulfonsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Impulse je Minute
dATP	deoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	deoxy-Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	deoxy-Guanosintriphosphat
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DR	direkte Sequenzwiederholung
dTTP	deoxy-Thymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	foetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HBcAg	Hepatitis B "Core"-Antigen
HBsAg	Hepatitis B Oberflächenantigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HPLC	high pressure liquid chromatography
IL-2	Interleukin 2
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilo-Basen
kD	Kilo-Dalton
mAk	monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NP40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
PBL	periphere Blutlymphozyten
PEG	Polyethylenglykol
pfu	"plaque forming units"
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PHA	Phytohämagglutinin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen je Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumlaurylsulfat
SG50	Sephadex G50
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
URF	"unidentified reading frame"
Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galaktosid

Aminosäuren:

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

H

LEBENS LAUF

Ina Koch

geboren am

03.05.1960

in

Duisburg

1966 - 1970

Grundschule in Rheinhausen

1970 - 1979

Heinrich-Heine-Gymnasium in Rheinhausen, Duisburg

Mai 1979

Abitur

1979 - 1984

Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1982 - 1983

Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Juli 1984

Diplomprüfung

1984 - 1985

Diplomarbeit:

"Vergleich verschiedener Detektionsmethoden

für die diagnostische Nitrozellulosefilter-

und In-Situ-Hybridisierung"

unter Anleitung von

Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider,

Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried,

Abteilung Virusforschung

1985 - 1988

Dissertationsarbeit unter Anleitung von

Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider,

Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried,

Abteilung Virusforschung

Aufgrund epidemiologischer Daten ist eine kausale Rolle des Hepatitis B Virus (HBV) bei der Entstehung eines primären Leberzellkarzinoms anzunehmen. Die molekularbiologische Rolle des Virus in der Onkogenese ist jedoch noch nicht geklärt. Die Analyse der in das Genom von Hepatomzellen integrierten HBV DNA zeigte eine große Heterogenität der Integrate, so daß heute angenommen wird, daß der karzinogene Einfluß in trans ausgeübt wird. Dadurch kann es zur Deregulation der Expression zellulärer Proteine kommen.

Aufgrund dessen wurden virusspezifische Expressionsprodukte einer genetisch gut charakterisierten Hepatomzelllinie sowie tumorspezifisch exprimierte zelluläre Proteine dieser Zelllinie untersucht, um folgende Fragen zu beantworten:

- Welchen Einfluß haben virale Expressionsprodukte auf die Zelle?
- Welche zellulären Gene können im Zuge der malignen Entartung de novo exprimiert werden?
- Wurde die Expression durch HBV-Einfluß stimuliert?
- Welche Funktion haben diese tumorspezifischen Proteine für die Onkogenese?

Ina Koch wurde am 3.5.1960 in Duisburg geboren. Nach dem Abitur am Heinrich-Heine-Gymnasium in Duisburg Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen und der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Diplom 1985. 1989 Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.